



**Departamento Biología Molecular**

# **Coordinación del citoesqueleto de actina y la acetilación de microtúbulos por la formina INF2**



**Jaime Fernández Barrera**

**Madrid 2017**



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

# **Coordinación del citoesqueleto de actina y la acetilación de microtúbulos por la formina INF2**

D. Jaime Fernández Barrera

Licenciado en bioquímica

Presenta esta memoria para optar al grado de Doctor en  
Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y  
Biotecnología

Director

Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero

Tesis doctoral realizada en el  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA  
Madrid, 2017

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero, Profesor de Investigación del CSIC. Esta tesis se ha podido llevar a cabo gracias a una Beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Ne frustra vixisse videar

Tycho Brahe

# **Resumen/Summary**

## Summary

Formins control both, the actin and microtubule cytoskeletons. Whereas their function on actin filament formation is well characterized, the role of formins on microtubules is not fully understood. In this study we have investigated the mechanism by which INF2, a formin mutated in degenerative renal and neurological hereditary disorders in humans, controls microtubule acetylation.

We found that knockdown of INF2 produced a dramatic drop in tubulin acetylation. This effect was not due to decreased stability or increased deacetylation but to the almost complete absence of  $\alpha$ -tubulinacetyltransferase1 ( $\alpha$ -TAT1). Activation of MRTF/SRF-dependent transcription, which is repressed by G-actin and which was found defective in INF2-knockdown cells, restored tubulin acetylation.

Consistently, several functional MRTF/SRF-responsive elements were identified in the  $\alpha$ -TAT1 gene. Therefore, INF2 that, as we show is a formin of particular relevance in controlling actin homeostasis, modulates the transcriptional activity of the MRTF/SRF complex and coordinates the actin cytoskeleton and microtubule acetylation by regulating the transcription of the  $\alpha$ -TAT1 gene. These results might bring some light to understand the molecular basis of human INF2-related diseases.

## Resumen

Las forminas regulan tanto el citoesqueleto de actina como el de microtúbulos. Y aunque su función en la formación de filamentos de actina ha sido extensivamente caracterizada, el papel que esta familia de proteínas tiene en la regulación del citoesqueleto microtubular no está bien caracterizado. En el presente trabajo se ha estudiado el mecanismo por el que INF2, una formina mutada en desórdenes degenerativos que afectan a riñón y sistema nervioso, controla la acetilación de microtúbulos.

Se observa que el silenciamiento de INF2 genera un descenso dramático en la acetilación de microtúbulos. Este fenotipo no se debe a un descenso de estabilidad de los microtúbulos celulares ni a una actividad descontrolada de las enzimas desacetilasas sino a la ausencia de la de la  $\alpha$ -tubulina acetil transferasa 1 ( $\alpha$ TAT1).

La activación de la vía MRTF/SRF de transcripción de genes, que es reprimida por G-actina y que es defectiva en células silenciadas para INF2, restaura la acetilación de tubulina. En concordancia con esto, se identifican varios elementos de respuesta a MRTF/SRF en el promotor del gen de  $\alpha$ TAT1. Estos resultados podrían ayudar a un futuro estudio de las bases moleculares de las enfermedades ligadas a INF2

# Índice



## Contenido

<b>Resumen/Summary .....</b>	<b>9</b>
Summary .....	11
Resumen.....	13
<b>Índice .....</b>	<b>15</b>
<b>Glosario.....</b>	<b>19</b>
Abreviaturas .....	21
<b>Introducción .....</b>	<b>23</b>
Los microfilamentos .....	26
Proteínas nucleadoras de actina .....	27
La familia de las forminas.....	28
Los microtúbulos y sus modificaciones postraduccionales.....	31
Características generales de los microtúbulos.....	31
Modificaciones de los microtúbulos .....	33
Regulación de la red microtubular por forminas .....	36
La dinámica de actina regula la transcripción de un número elevado de genes relacionados con la citoarquitectura .....	36
La formina INF2 .....	39
<b>Objetivos.....</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>47</b>
Anticuerpos .....	49
Inhibidores y otros reactivos.....	50
Línea celular .....	50
Cultivos celulares.....	50
Generación de clones estables.....	50
Plásmidos .....	51
Electroforesis e inmunotransferencia.....	51
Transfección .....	52
Preparación de muestras para inmunofluorescencia y microscopía confocal .....	52
Ensayos de promotores.....	53
RT-PCR cuantitativa .....	54
Medida de la relación de G-/F-actina.....	55

<b>Resultados .....</b>	<b>57</b>
El silenciamiento de INF2 reduce dramáticamente la acetilación de microtúbulos.....	59
La inhibición de la acetilación de microtúbulos debido al silenciamiento de INF2 no es debido a un descenso en su estabilidad .....	65
La inhibición de la desacetilación de microtúbulos no recupera la acetilación de tubulina en las células INF2 KD.....	67
La disminución de la acetilación de tubulina en las células INF2 KD se debe a un descenso en los niveles de $\alpha$ -TAT1 .....	68
INF2 requiere su actividad polimerizadora de actina para promover la acetilación de tubulina .....	70
La expresión de fragmentos de INF2 con actividad polimerizadora de actina recupera la acetilación de los microtúbulos en las células INF2 KD .....	73
El silenciamiento de la formina DIA1 no produce un descenso en la acetilación de microtúbulos celulares .....	74
El silenciamiento de INF2 altera la relación G-/F-actina .....	75
La vía de señalización MRTF/SRF está afectada en las células INF2 KD.....	77
La presencia de MRTF en el núcleo es menor en las células INF2 KD.....	80
El gen $\alpha$ -TAT1 contiene elementos de respuesta a MRTF/SRF.....	83
<b>Discusión.....</b>	<b>87</b>
Relación de las forminas con los microtúbulos.....	89
Activación de INF2 en respuesta a G-actina.....	92
La mecanosensación y las forminas .....	93
Regulación del coactivador MRTF-A por INF2.....	94
Patologías relacionadas con INF2.....	95
<b>Conclusiones .....</b>	<b>97</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>101</b>

# **Glosario**

## Abreviaturas

A: Adenina

$\alpha$ TAT:  $\alpha$ -Tubulina acetil transferasa 1

$\alpha$ -tub:  $\alpha$ -tubulina

Ac-tub: Tubulina acetilada

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Álbúmina bovina de suero

C: Citosina

CArG: Secuencia de ADN CC(X)<sub>6</sub>GG donde X es A ó T.

CRIB: Dominio de unión a Cdc42 y Rac

DAD: Dominio autorregulatorio de las Drf

DIA1: Formina Diaphanous 1

DID: Dominio inhibitorio de las Drf

Drf: Forminas relacionadas con la proteína Diaphanous

F-actina: Actina polimérica

FH: Dominio de homología a forminas

FMN1: Formina 1

FMNL1: Proteína similar a formina 1

$\gamma$ -tub:  $\gamma$ -tubulina

G: Guanina

G-actina: Actina monomérica

GBD: Dominio de unión a GTPasas

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Del inglés proteína fluorescente verde

GTP: Guanosina trifosfato

Glu-MT: Microtúbulos detirosinados

h: Horas

INF1: Formina inversa 1

INF2: Formina inversa 2

KD: Células silenciadas

mDia1: Formina Diaphanous 1 murina

µm: Micrómetros

MRTF: Factor de transcripción similar a la miocardina

MT: microtúbulos

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

PBS: Tampón fosfato

pGlu-tub: Tubulina poliglutaminada

shARN: ARN pequeño en horquilla

SRF: Factor de respuesta a suero

SRE: Elemento de respuesta a SRF

RPE1: Células de epitelio retinal pigmentario 1

RT-PCR: Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

T: Timidina

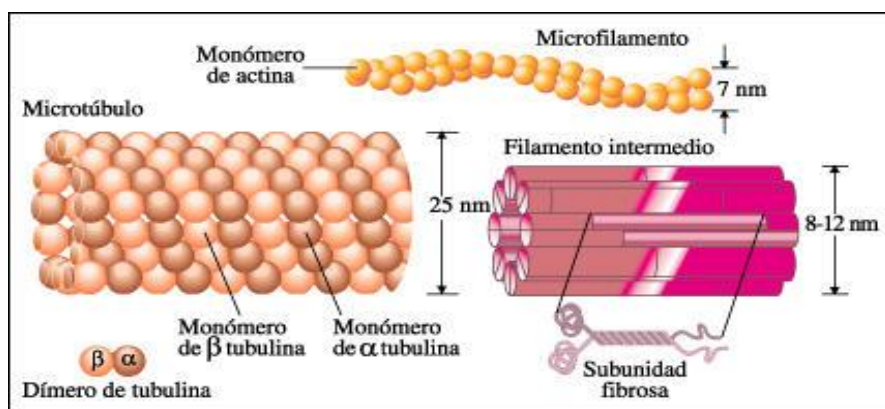
Tyr-MT: Microtúbulos tirosinados

WH2: Dominio de homología con WASP

# Introducción

Las células eucariotas presentan una morfología muy variada y poseen una organización interna compleja. Además, son capaces de variar su forma –sirvan como ejemplos la contracción de las células musculares, la formación del axón neuronal o la división celular- y de redistribuir rápidamente sus orgánulos en respuesta a estímulos externos, durante la polarización celular y en el proceso de migración celular. Esta capacidad depende de una red compleja de filamentos presentes en el citoplasma, que constituyen el citoesqueleto.

Los dos tipos más importantes de elementos del citoesqueleto son los filamentos de actina, llamados también microfilamentos (7 nm de diámetro), y los microtúbulos (25 nm de diámetro). Ambos son altamente dinámicos y se ensamblan y desensamblan continuamente en la célula. Otro tercer tipo de componente del citoesqueleto, de diámetro intermedio entre los microfilamentos y los microtúbulos, son los llamados filamentos intermedios, (8-12 nm de diámetro) que son mucho más estables que los anteriores. Estos tres tipos de fibras son polímeros altamente organizados que se ensamblan a partir de subunidades proteicas pequeñas –actina en el caso de los microfilamentos, tubulina en el de los microtúbulos, y proteínas fibrosas como la queratina, la vimentina o las láminas en el caso de los filamentos intermedios- que se mantienen unidas por enlaces no covalentes (Figura 1).



**Figura 1. Filamentos celulares.** Se muestran esquemas de los microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtúbulos con indicación de su diámetro aproximado y del tipo de monómeros que los constituyen.

Además de los tres tipos de filamentos, el citoesqueleto contiene una gran variedad de proteínas accesorias que unen cada tipo de filamento entre sí o a otros componentes celulares, como la membrana plasmática, y que facilitan su polimerización o su desensamblaje, y regulando la velocidad y la longitud de los filamentos o los estabilizan. El presente trabajo se centrará en el estudio de los citoesqueletos de actina y microtúbulos, y pondrá un énfasis especial en la familia de las forminas, que regulan la dinámica y la función de ambos tipos de filamentos.

## Los microfilamentos

Todas las especies eucariotas poseen múltiples genes que codifican para moléculas de actina que difieren en unos pocos aminoácidos y que se expresan a menudo de forma diferencial en distintos tipos celulares o tejidos o durante las diferentes etapas del desarrollo o la diferenciación. En humanos existen seis genes que codifican para distintas actinas, de los que cuatro codifican isoformas de  $\alpha$ -actina, presentes en células musculares, y dos para la  $\beta$ -actina y la  $\gamma$ -actina que se expresan en el resto de los tipos celulares.

El monómero de actina, conocido también como actina globular o G-actina, se asocia a un átomo de  $Mg^{2+}$ , que estabiliza la conformación globular, y a una molécula de ATP. El fosfato terminal del ATP se hidroliza cuando la G-actina polimeriza formando filamentos que se denominan actina filamentosa o F-actina. Si la concentración de G-actina es adecuada, su polimerización puede ser inducida *in vitro* con tan solo elevar la concentración de los iones  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ , o  $Na^+$  en un proceso que puede ser revertido mediante la disminución de la fuerza iónica del medio. Esto indica que la polimerización de actina no requiere necesariamente de la participación de otros factores ajenos a la propia proteína.

Los filamentos de actina son estructuras polares, lo que significa que sus dos extremos son diferentes. Esto es debido a la disposición lineal y orientada de sus subunidades que confiere así mismo una orientación específica al polímero. En un límite del filamento se encuentra el extremo (-), que expone la hendidura que se une a



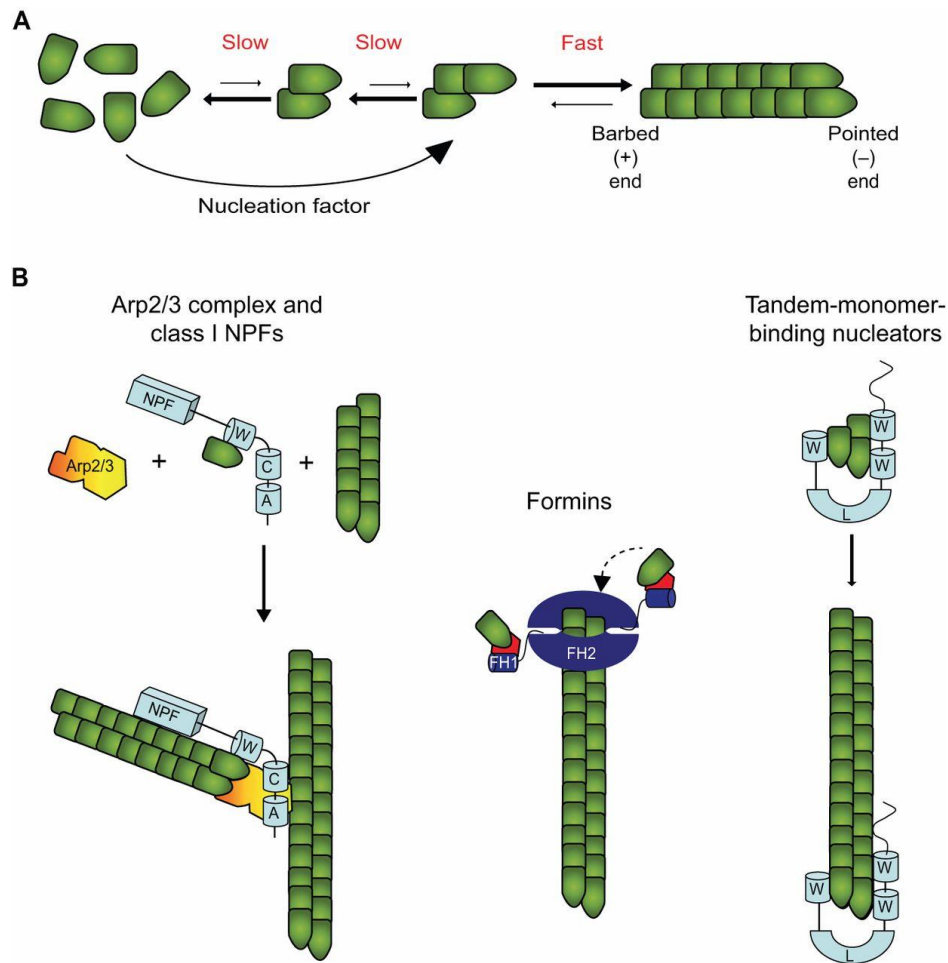
la moléculas de ATP de la última molécula de actina del polímero, y que es el sitio por donde se produce la despolimerización de los filamentos; mientras que el extremo opuesto, que se le conoce como extremo (+), tiene lugar la adición de nuevas subunidades de actina.

### **Proteínas nucleadoras de actina**

El primer paso en la formación de F-actina es la nucleación, que se define como la formación de un multímero estable de monómeros de actina. En la célula, éste es el paso limitante debido a la inestabilidad de los dímeros de actina y a la presencia de proteínas que secuestran a la G-actina e impiden su polimerización. Para iniciar la formación de multímeros de actina la célula utiliza una serie de proteínas nucleadoras entre las que se incluyen el complejo Arp2/3, los nucleadores que unen monómeros en tándem (tándem WH2 domain-based nucleators), y las forminas (Figura 2).

El complejo Arp2/3 consta de dos proteínas relacionadas con la actina (Arp2 y Arp3) y cinco subunidades adicionales (ARPC1-5). Este complejo no es, por sí solo, un nucleador eficiente de actina, sino que requiere de factores adicionales. El complejo Arp2/3 nuclea la formación de nuevos filamentos que se ramifican con un ángulo de 70° de los filamentos ya existentes, formando redes con forma de Y. En el grupo de nucleadores de actina que unen monómeros de G-actina en tándem se incluyen las proteínas Spire, cordon-bleu, leiomodina, JMY y la proteína APC (adenomatous polyposis coli). Estas proteínas contienen motivos de unión a G-actina posicionados en tándem, como el WH2 (WASP homology 2), que aproximan monómeros de actina para así nuclear su polimerización.

El tercer grupo de nucleadores de actina, y el segundo cuantitativamente más abundante después del complejo Arp2/3, es el formado por la familia de las forminas. Las forminas, a diferencia del complejo Arp2/3 que forma filamentos ramificados, forma filamentos lineales de actina.



**Figura 2. Formación de polímeros de actina.** (A) Los pasos de dimerización y trimerización de actina requieren de factores de nucleación para que el proceso tenga lugar de forma eficiente y poder así generar polímeros. (B) El complejo Arp2/3, activado por un NPF (Factor promotor de la nucleación) nuclea un nuevo filamento que surge de forma lateral a otro preexistente. Las forminas se asocian al extremo (+) de los filamentos de actina y promueven el alargamiento de los mismos mediante su dominio FH2, utilizando para ello monómeros de actina reclutados por la interacción de su dominio FH1 a la profilina a la que están unidos. Los nucleadores que unen monómeros en tándem, tales como cordon bleu contribuyen a la formación de un filamento de actina mediante el ensamblaje y estabilización de un núcleo de unas pocas subunidades de G-actina a sus dominios WH2, que unen G-actina. A, región ácida, C, conector central, L, región linker, W, dominio WH2.

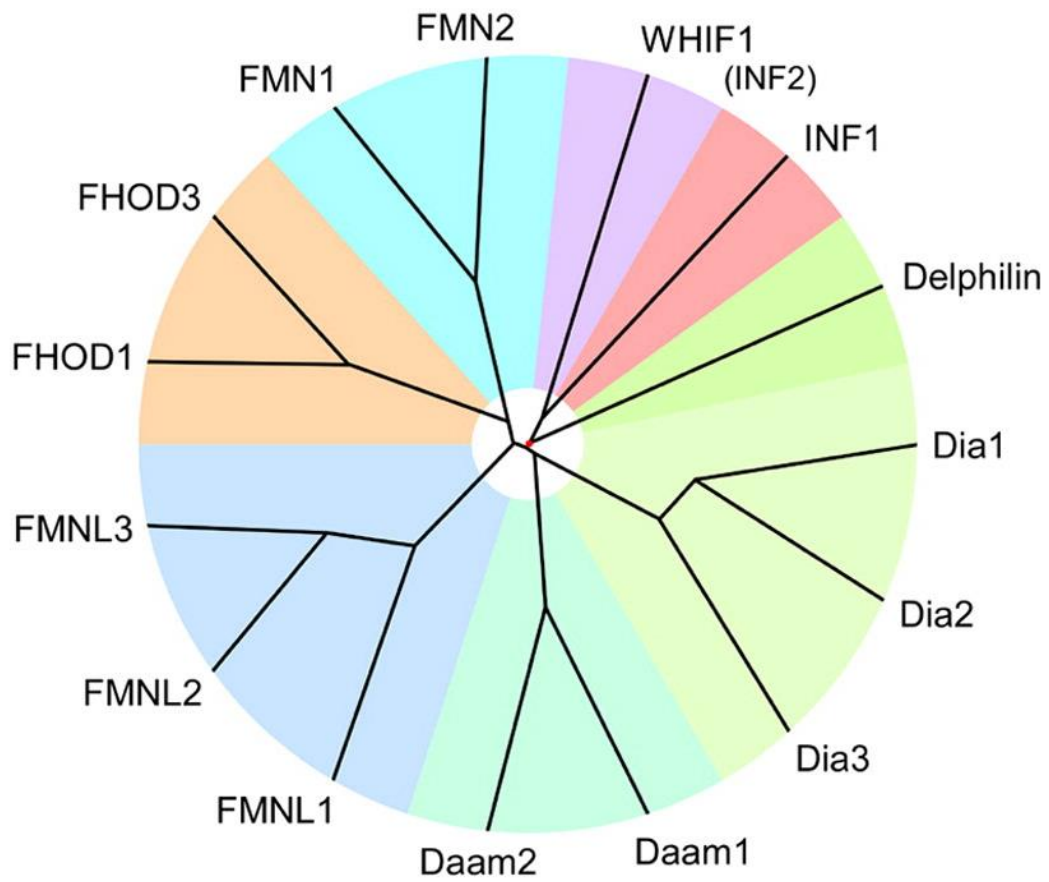
### La familia de las forminas

Las forminas desempeñan un papel muy importante en una gran variedad de procesos celulares tales como la movilidad de los endosomas, la migración celular y la citocinesis (Faix and Grosse, 2006).

Las proteínas de esta familia son capaces de nuclear actina y de actuar como factores elongadores asociándose al extremo (+) del filamento para permitir la adición de nuevas subunidades de actina e impedir la finalización de la polimerización.

El dominio funcional más relevante de las forminas es su dominio FH2 (formin homology 2), situado en el centro de su secuencia, que comprende entre 350-400 aminoácidos y es el más conservado en las distintas forminas (Higgs and Peterson, 2005). Este dominio actúa de forma homodimérica, estabilizando la formación dímeros de actina para catalizar su nucleación. Cuando se añaden a una mezcla de F-actina y actina monomérica (G-actina) fragmentos purificados que contienen dominios FH2 recombinantes, éstos son capaces de unirse al extremo (+) de los filamentos e impedir que las llamadas proteínas taponadoras (“capping proteins”) hagan que la polimerización termine, promoviendo además el alargamiento de los microfilamentos (Kovar and Pollard, 2004; Moseley et al., 2004; Zigmond, 2004). Para que este proceso tenga lugar, los dos dominios FH2 han de unirse de manera antiparalela, formando una “argolla” que abraza al filamento de actina (Sharma et al., 2014) y avanzar a medida que crece el polímero, situándose siempre en su extremo (+), posicionándose así en el lugar adecuado para realizar su función de adición de monómeros de actina de forma progresiva (Figura 2B, panel central). El dominio FH1 se sitúa en las forminas adyacente al extremo amino del dominio FH2. Este dominio es muy rico en prolina y su función es estimular el alargamiento del filamento mediante la unión de profilina, que lleva unida G-actina, aumentando de esta forma la concentración local de G-actina para la adición de nuevos monómeros al extremo (+) del filamento.

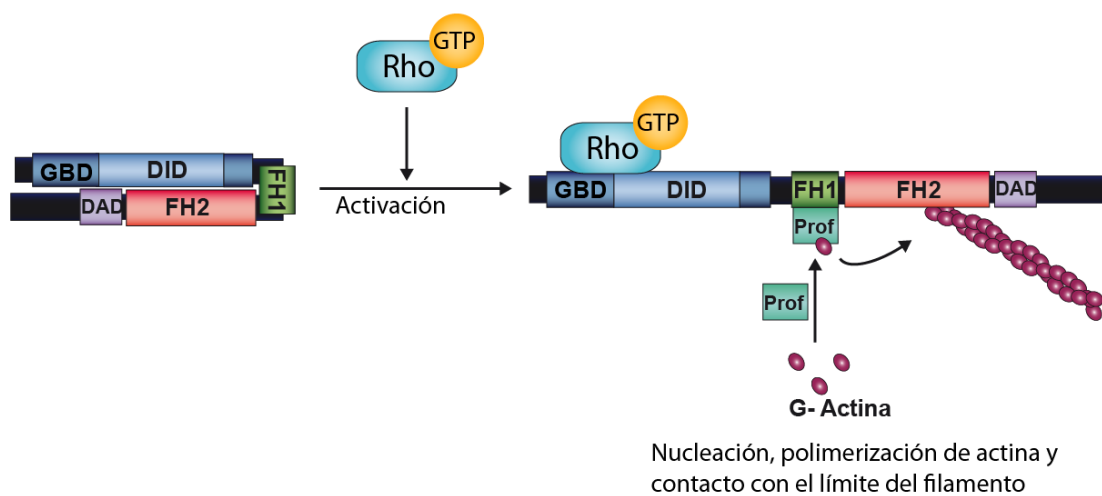
En humanos existen 15 forminas diferentes agrupadas en 8 subfamilias: Dia, Damm, FMNL, FHOD, FMN, INF2 e INF1 (Schönichen and Geyer, 2013) (Figura 3).



**Figura 3. Análisis filogenético de las forminas humanas basado en la homología de secuencia de sus dominios FH2 (tomado de (Schönichen and Geyer, 2013)).**

Las forminas más estudiadas son las denominadas Drf (Diaphanous-related formins) que incluyen las subfamilias Dia, Daam y FMNL, que son próximas en secuencia y en su organización estructural en dominios proteicos. Estas forminas poseen un dominio DID (Diaphanous inhibitory domain), cercano a su extremo amino terminal, que interacciona con un dominio DAD (Diaphanous autoregulatory domain) presente en la zona carboxilo terminal, haciendo que la formina se pliegue sobre si misma en una conformación inactiva (Wallar et al., 2006) que oculta los dominios FH1 y FH2. La activación de estas forminas se produce cuando una RhoGTPasa específica en su forma cargada con GTP interacciona con el dominio GBD (GTPase binding domain), que ocupa el extremo amino terminal de la molécula de formina y solapa parcialmente con el dominio DID. La unión de la RhoGTPasa rompe la interacción DID-DAD y despliega la formina de forma que expone los dominios FH1 y FH2, activándose (Goode and Eck, 2007)(Figura 4). La interacción entre la RhoGTPasa y la formina se produce en

dos zonas distintas. En el caso de la formina mDia1 la parte de GBD que no solapa con DID, denominada región G, interacciona con la zona “interruptor 1” de la Rho GTPasa RhoC mientras que solapa con DID lo hace con la región del interruptor 2” (Rose et al., 2005). Este sistema de regulación por autoinhibición permite generar formas constitutivamente activas de este tipo de forminas eliminando el dominio DID o el DAD de su estructura.



**Figura 4. Representación esquemática de la activación de las Drfs por GTPasas específicas de la familia Rho.** En su conformación inactiva las Drfs están plegadas por la interacción del DID con el DAD. Tras la unión de una Rho GTPasa específica al dominio DID, se rompe la interacción del DID con el DAD y se abre la molécula, adoptando la forma desplegada, que es la conformación activa.

## Los microtúbulos y sus modificaciones postraduccionales

### Características generales de los microtúbulos.

Los microtúbulos son polímeros constituidos por la unión de heterodímeros de subunidades de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina que se unen organizándose en forma de cilindro hueco. Debido a su estructura, los microtúbulos son más rígidos que los microfilamentos y los filamentos intermedios. Existen múltiples genes que codifican para  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina con diferencias pequeñas en su secuencia, principalmente en su extremo carboxilo terminal. Solamente algunos tipos de microtúbulos especializados (p. ej. los

microtúbulos del axonema de los cilios, o los microtúbulos neuronales) dependen de ciertos isoformas de  $\beta$ -tubulina, mientras que la función del resto de los microtúbulos parece independiente de su composición.

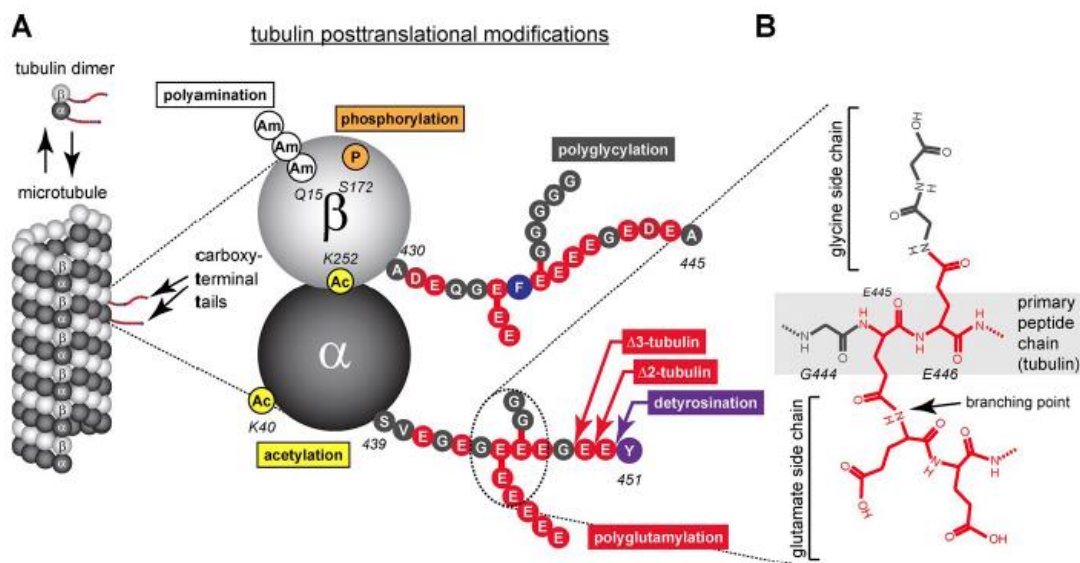
Cada dímero de tubulina une dos moléculas de GTP. Una de ellas está siempre unida a su subunidad  $\alpha$  y no se hidroliza, mientras que la segunda se une de forma reversible a su subunidad  $\beta$  y se hidroliza a GDP una vez constituido el polímero. Las interacciones laterales y longitudinales entre las subunidades son responsables del mantenimiento de la forma tubular. Las interacciones longitudinales entre la cabeza y la cola de las subunidades forman un protofilamento. A través de interacciones laterales, los protofilamentos se asocian dando lugar a una estructura cilíndrica que está compuesta de 13 protofilamentos y que solamente en algunas raras excepciones los contiene mayor o menor número. Como consecuencia de la organización orientada de los dímeros de tubulina en los protofilamentos, los microtúbulos, de forma similar a los filamentos de actina, son estructuras polares, distinguiéndose un extremo (+) y un extremo (-). El extremo (+) puede añadir o perder dímeros, dando lugar a los procesos de crecimiento o catástrofe, mientras el extremo (-) está protegido por proteínas que impiden tanto su alargamiento como su acortamiento.

En las células animales en interfase, los microtúbulos vertebran, desde el centrosoma, una gran red radial que se extiende hasta la periferia celular. Los extremos (-) de los microtúbulos contactan con el centrosoma, estructura en la que se nuclean y desde dónde se alargan, siempre por su extremo (+), actuando como el centro organizador de microtúbulos (MTOC) principal de la célula. Esta característica de generar y alargar microtúbulos se encuentra además en otros MTOCs, llamados MTOCs secundarios, de la célula. Los MTOCs contienen  $\gamma$ -tubulina, que forma parte de un complejo de 25 S llamado  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin ring complex). Este complejo nuclea el ensamblaje de microtúbulos a concentraciones de tubulina a las que no podría polimerizar por sí sola, cebando el proceso mediante una hilera de moléculas de  $\gamma$ -tubulina o formando un protofilamento al que se unen directamente los dímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.

Los microtúbulos se clasifican según su longevidad, es decir, en función del tiempo que permanecen polimerizados, en microtúbulos dinámicos, que tienen una vida de entre 5-10 minutos, y microtúbulos estables que se mantienen por un tiempo superior a una hora.

### Modificaciones de los microtúbulos

Los microtúbulos estables, por el mero hecho de permanecer polimerizados, tienen más probabilidad de ser diana de enzimas que introducen modificaciones postraduccionales covalentes en su estructura y de acumularlas (Janke and Bulinski, 2011). Estas modificaciones pueden ser: Acetilación, fosforilación, detirosinación, poliglutamilación y poliglicinación (Figura 5). A semejanza de las modificaciones que sufren las histonas (Strahl and Allis, 2000), se ha propuesto que las modificaciones de la tubulina pueden constituir un código que sería interpretado para distintas funciones celulares (Janke, 2014), el “Código de la tubulina”.



**Figura 5. Modificaciones postraduccionales de la tubulina.** A) Representación esquemática de la distribución de los diferentes tipos de modificaciones postraduccionales con respecto a su posición en la estructura microtubular. La acetilación (Ac), fosforilación (P), y poliaminación (Am) se producen en el cuerpo de la tubulina, mientras que la poliglutamilación, la poliglicinación y la detirosinación tienen lugar en el extremo carboxilo terminal que sobresale de la superficie del microtúbulo. B) Estructura química del péptido ramificado formado por poliglutamilación y poliglicinación, utilizando los grupos γ-carboxilos de los residuos de glutamato modificados como sitios aceptores para las uniones isozeptídicas (tomado de (Janke, 2014)).

Por ejemplo, podrían ser reconocidas por determinados motores moleculares, guiando así el transporte de moléculas cargo a determinadas zonas de la célula (Dompierre et al., 2007; Konishi and Setou, 2009; Kreitzer et al., 1999; Lin et al., 2002; Reed et al., 2006)

Los tres tipos de modificaciones postraduccionales más estudiados son la acetilación, la poliglutamilación y la detirosinación, por lo que estas modificaciones se desarrollan a continuación con más detalle.

#### *- La acetilación de microtúbulos*

La modificación de la tubulina más estudiada es la acetilación, descubierta originalmente en los flagelos de *Chlamydomonas* (L'Hernault and Rosenbaum, 1985), que consiste en la adición de un grupo acetilo a la lisina 40 de la  $\alpha$ -tubulina. Esta modificación tiene la peculiaridad respecto a las otras modificaciones de que se produce en la cara interna de los microtúbulos (Janke and Bulinski, 2011; Nogales et al., 1999; Wloga and Gaertig, 2010). Se acumula en los microtúbulos estables como los encontrados en el cilio primario, los centriolos, parte de las redes pericentrosomales de células en interfase, los husos mitóticos y los puentes intercelulares formados durante la citocinesis (Perdiz et al., 2011).

La acetilación de los microtúbulos es llevada a cabo por la  $\alpha$ -tubulina-acetiltransferasa 1 ( $\alpha$ TAT1). Esta transacetilasa toma un grupo acetilo del acetil-coenzima A para transferírsele a la citada lisina de la  $\alpha$ -tubulina, con la que establece un enlace amida (Shida et al., 2010). La  $\alpha$ TAT1 es, además, no redundante (Kalebic et al., 2013), ya que cuando su expresión es silenciada se pierde la acetilación de microtúbulos a nivel global. El proceso contrario, la desacetilación de los microtúbulos, es llevado a cabo por la enzima HDAC6 que pertenece al grupo de las histona desacetilasas y que posee una localización citoplásmica y una especificidad enzimática por la tubulina.

Aunque la acetilación de la tubulina no afecta de forma significativa a la estructura de los microtúbulos polimerizados *in vitro* (Howes et al., 2014) podría



afectar a la unión de proteínas en la cara interna del microtúbulo (Bouchet-Marquis et al., 2007; Burton, 1984; Garvalov et al., 2006). Se ha descrito su importancia en los procesos de adhesión e inhibición por contacto en fibroblastos (Aguilar et al., 2014), y en eventos tempranos de polarización en neuronas *in vivo* (Hammond et al., 2010; Reed et al., 2006). En *C. elegans* se ha observado que es importante en el mantenimiento del número de protofilamentos por microtúbulo en los axones de neuronas sensoriales y, también, en el cierre de la estructura tubular (Cueva et al., 2012). En consonancia con estas observaciones, la presencia de microtúbulos acetilados es necesaria para que la mecanosensación en *C. elegans* y en ratón se produzca con normalidad (Morley et al., 2016; Shida et al., 2010) y para una correcta formación del giro dentado en ratones (Kim et al., 2013). Se ha observado recientemente que los microtúbulos acetilados, si bien mantienen su estructura estática, son más resistentes a las fuerzas de flexión y pueden recuperar su forma más fácilmente y un mayor número de veces tras ser flexionados que aquellos no acetilados (Portran et al., 2017; Xu et al., 2017).

#### - La poliglutamilación de microtúbulos

Es una modificación química reversible de los microtúbulos y consiste en la formación de un enlace entre el carboxilo  $\epsilon$  de un glutamato de la cadena polipeptídica de la tubulina y el grupo amino de un glutamato libre. A esta adición sigue la generación de una pequeña cadena polipeptídica de glutamatos a partir del situado en primer lugar.

#### - La detirosinación de microtúbulos

La detirosinación consiste en la eliminación del residuo tirosina del extremo carboxilo terminal de la  $\alpha$ -tubulina. De esta forma, la tubulina pasa de terminar en un residuo de tirosina (Tyr-microtúbulos) a terminar en un residuo de ácido glutámico (Glu-microtúbulos), en referencia al penúltimo residuo de esta tubulina, que queda expuesto. Este proceso se puede revertir. Estas dos poblaciones de microtúbulos pueden distinguirse con anticuerpos específicos contra el extremo carboxilo terminal de la  $\alpha$ -tubulina. Normalmente, en la célula existe una gran mayoría de Tyr-microtúbulos, algunos Glu-microtúbulos y muy pocos microtúbulos mixtos (Bulinski and Gundersen, 1991).

## **Regulación de la red microtubular por forminas**

Aunque la función más conocida de las forminas es la de la formación de filamentos de actina, las forminas actúan también sobre el citoesqueleto microtubular. La sobreexpresión de fragmentos constitutivamente activos de distintas forminas modifica la disposición de los microtúbulos provocando su alineación con las fibras de estrés (Ishizaki et al., 2001), que están formadas por filamentos de actina y moléculas de miosina. También produce una mayor estabilización de los microtúbulos e induce su acetilación (Copeland et al., 2004; Thurston et al., 2012; Young et al., 2008).

La mayor parte de las forminas analizadas (Dia1, Dia2, INF2, Fmn-1b e INF1) interaccionan directamente con los microtúbulos, (Gaillard et al., 2011; Young et al., 2008; Zhou et al., 2006). Tanto Dia1, Dia2 como INF2 tienen su dominio de interacción con los microtúbulos en su dominio FH2, que por lo tanto coincide físicamente con el dominio implicado en la polimerización de actina (Bartolini et al., 2016; Bartolini et al., 2008; Gaillard et al., 2011). Ambas actividades no son interdependientes ya que en mDia2 la sustitución por alanina de la isoleucina 704 ó de la lisina 853, residuos clave para la actividad polimerizadora de actina, no eliminan su capacidad para estabilizar microtúbulos y la posibilidad de que, por lo tanto, acumulen modificaciones postraduccionales, a pesar de la pérdida de su capacidad polimerizadora de actina (Bartolini et al., 2008). Otras forminas, sin embargo, poseen sus dominios de interacción con microtúbulos segregados de los dominios FH2, como es el caso de INF1 que se une a los microtúbulos por una región situada en su extremo carboxilo terminal (Young et al., 2008) o Fmn1 en la que el dominio de unión se localiza en la parte amino terminal (Zhou et al., 2006).

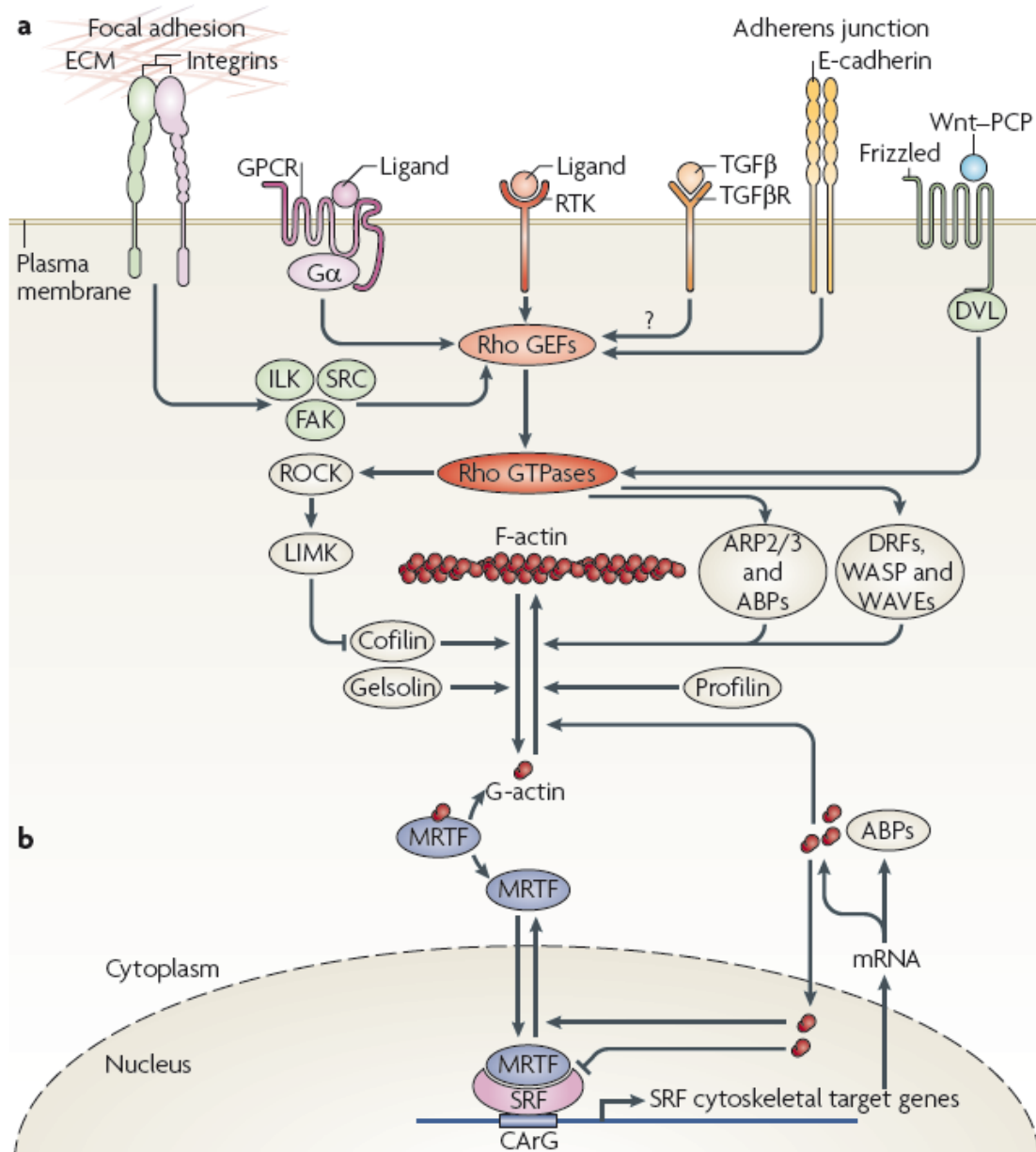
## **La dinámica de actina regula la transcripción de un número elevado de genes relacionados con la citoarquitectura**

Las células sufren cambios continuos en su forma, posición e interacción con otras células durante el desarrollo embrionario y también como componentes

funcionales de los organismos multicelulares una vez que estos han madurado. Estos cambios requieren un comportamiento dinámico de las células de forma que puedan migrar, adherirse y contraerse. Todos estos cambios están controlados por el citoesqueleto de actina y requieren de la síntesis de nuevos componentes para poder llevarse a cabo. Por esta razón, la dinámica de la actina necesita estar estrechamente sincronizada con la actividad transcripcional de los genes que codifican para proteínas del citoesqueleto.

La vía de señalización MRTF/SRF (Factor de transcripción similar a miocardina/factor de respuesta a suero) es un mecanismo de expresión génica regulado por la dinámica celular de la actina. El factor de transcripción MRTF (que presenta isoformas A y B) posee dos dominios de importe al núcleo amino terminales, el dominio B1 y el dominio bipartito B2-B3 (cajas básicas) (Miralles et al., 2003; Pawlowski et al., 2010). Sin embargo, solapando con el dominio B2-B3 se encuentran tres dominios RPEL (llamados así por su secuencia consenso RPxxxEL), de unión a actina monomérica (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003), que, una vez unida a MRTF, bloquea estas secuencias de importe, aportando además sus secuencias de exporte nuclear para situar al complejo en el citoplasma. En este caso la actividad transcripcional mediada por MRTF/SRF se encuentra imposibilitada.

La distribución nuclear o citoplasmática de las proteínas MRTF está regulada, por tanto, por los niveles citoplasmáticos y nucleares de G-actina libre. Cuando tienen G-actina unida, los MRTFs esconden su señal de importe nuclear y se mantienen inactivos en el citoplasma. Sin embargo cuando los niveles de G-actina libre son bajos, cosa que ocurre cuando la célula ha formado muchas fibras de estrés, los MRTF exponen su señal de importe nuclear y entran en el núcleo. Allí dos moléculas de MRTF se asocian a un dímero de SRF, que se encuentra reconociendo unos elementos de ADN denominados CArG, que tienen como secuencia consenso CC(X)<sub>6</sub>GG, dónde X puede ser A o T) (Figura 6).



**Figura 6. Esquema de la ruta de activación de la transcripción por el complejo MRTF/SRF. a)** La activación de distintas clases de receptores de membrana afecta a la homeostasis de la actina. Estos receptores, a través de GTPasas de la familia Rho, de la quinasa ROCK, del complejo Arp2/3, de las forminas o de otras proteínas afectan a la dinámica de actina y regulan los niveles de G-actina libre. **b)** Según los niveles resultantes de G-actina libre, el coactivador MRTF se encontrará inactivo en el citoplasma unido a la G-actina, o en el núcleo, libre de G-actina y unido al factor SRF. Cuando ambos factores están unidos formando un complejo, se produce la transcripción de genes con elementos CArG, muchos de ellos relacionados con el citoesqueleto de actina, con el consiguiente aumento de los niveles celulares de estas proteínas.

Se han descrito más de 300 genes que responden a la activación del complejo y que contienen este tipo de elementos en su región promotora y/o en alguno de sus exones e intrones. Muchos de estos genes codifican para proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, como por ejemplo varias de los genes que codifican para miosinas, tropomiosinas, transgelina, smoothelina, vinculina, cofilina, gelsolina, villina, filamina y talina. Por lo tanto, los niveles de G-actina pueden regular la síntesis de muchos de los componentes del citoesqueleto, que a su vez hacen posible que la célula remodele de forma muy extensa su morfología para adaptarse a las demandas fisiológicas.

### **La formina INF2**

La formina INF2 (Formina inversa 2) fue originalmente clasificada en la subfamilia de las forminas inversas (junto a INF1), que se caracteriza por la ausencia de dominios reguladores en el extremo amino terminal de la proteína. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que INF2 posee estas secuencias reguladoras por lo que, aunque conserva la denominación, no pertenece a dicha subfamilia sino que es el único miembro de una nueva subfamilia (Madrid et al., 2010). La estructura general de INF2 es semejante a la de las Drfs. Consta de dominios DID, FH1, FH2 y DAD y posee una región en su extremo carboxilo más grande que en las Drf. A diferencia de las Drfs, no posee un dominio GBD en el extremo amino por lo que la interacción con GTPasas de la familia Rho posiblemente requiera de la presencia de alguna proteína adicional. INF2 presenta dos isoformas, INF2-1 e INF2-2, que difieren en su extremo carboxilo terminal debido al procesamiento alternativo del precursor de su ARN mensajero: INF2-1 posee una secuencia de 18 aminoácidos que termina con un motivo *CaaX* de prenilación (donde *a* suele ser un aminoácido alifático y X un aminoácido hidrofóbico, que es el que determina si la modificación es del tipo farnesilación o geranilgeranilación), mientras que INF2-2 presenta una secuencia de 9 aminoácidos con varios aminoácidos básicos. INF2-1 se localiza en las membranas del retículo endoplásmico gracias al residuo de farnesilo unido covalentemente a su extremo carboxilo, mientras que INF2-2 se distribuye por todo el citosol (Chhabra et al., 2009; Madrid et al., 2010).

Una característica estructural muy importante de INF2 es la presencia de un motivo WH2 dentro de su dominio DAD que hace que INF2 pueda unir G-actina. Este motivo, además, confiere a la molécula de INF2 la capacidad de trocear y despolimerizar filamentos de actina *in vitro* (Chhabra and Higgs, 2006). La capacidad del WH2/DAD de INF2 de unir G-actina le proporciona a la molécula la propiedad, en principio única en las forminas, de ser regulada por los niveles de G-actina libre, al igual que los factores MRTF. Así, la unión de G-actina al WH2/DAD de INF2 interfiere con la unión al DID, libera a INF2 de la interacción DID-DAD inhibitoria, y produce como resultado la apertura de la molécula y la activación de su actividad polimerizadora de actina.

Debido a su papel en la dinámica de actina, INF2 regula el transporte vesicular (Andres-Delgado et al., 2010; Madrid et al., 2010), el proceso de fisión durante la división mitocondrial (Korobova et al., 2013; Manor et al., 2015), la formación y maduración de las adhesiones focales (Skau et al., 2015) y la formación y el tamaño de los podosomas (Panzer et al., 2016). Además, en respuesta a estímulos mecánicos y a incrementos en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , INF2 actúa como mecanosensor, generando un anillo perinuclear de actina que (como se ha comprobado con el formado por FMN1) brinda protección a la envuelta nuclear y evita la ruptura de las cadenas de ADN en condiciones de estrés mecánico (Shao et al., 2015; Skau et al., 2016; Wales et al., 2016). De forma similar a otras forminas (Bartolini and Gundersen, 2010), INF2 interacciona directamente con los microtúbulos (Bartolini et al., 2016; Gaillard et al., 2011), y su sobreexpresión promueve la formación de estructuras microtubulares detirosinadas (Andres-Delgado et al., 2012; Bartolini et al., 2016) y la acetilación de los microtúbulos (Thurston et al., 2012).

Determinadas mutaciones en el dominio DID de INF2 son causa de alrededor del 10-15% de los casos de glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS) autosómica dominante (Barua et al., 2013; Brown et al., 2010), que es una enfermedad degenerativa que frecuentemente conduce a un fallo renal. En ocasiones (Paul et al., 1990), la FSGS lleva asociada la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), una

neuropatía degenerativa de carácter hereditario que afecta a los nervios periféricos motores y sensoriales y que produce debilidad, degeneración muscular y pérdida de sensibilidad en las extremidades del cuerpo. Además de las mutaciones que producen solamente FSGS, otras mutaciones en el dominio DID de INF2 son causantes de aproximadamente el 75% de los casos de FSGS asociada con CMT (Boyer et al., 2011). La mayor parte de los escasos estudios sobre el papel molecular de INF2 en estas enfermedades se ha centrado en su función sobre el citoesqueleto de actina, sin embargo, los trabajos recientes llevados a cabo en *C. elegans* sugieren que tanto al citoesqueleto de actina como los microtúbulos podrían verse afectados (Shaye and Greenwald, 2015).

# Objetivos



Partiendo del hecho de que las forminas actúan tanto sobre el citoesqueleto de actina como sobre los microtúbulos y considerando la relevancia de la formina INF2 y sus características funcionales específicas, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Investigar el papel de la formina INF2 en la estabilidad y la acetilación de los microtúbulos.
- Relacionar el efecto de INF2 sobre el citoesqueleto de actina y la actividad de la enzima  $\alpha$ -acetyl tubulina transferasa 1 ( $\alpha$ TAT1), que es la responsable de la acetilación de los microtúbulos.
- Establecer un modelo que explique el papel dual de INF2 sobre el citoesqueleto de actina y de tubulina.

# **Materiales y métodos**

**Anticuerpos**

Anticuerpo	Casa Comercial	Especie	Dilución WB	Dilución IF	Referencia	
233	inmunización	Conejo	1/500	1/300		
Tubulina acetilada	Sigma-Aldrich	Ratón monoclonal IgG2b	1/2000	1/700	6.11b-1 T7451	
Tubulina poliglutaminada	Adipogen	Ratón monoclonal IgG1	1/1000	1/1000	GT335 AG-20B-0020	
$\alpha$ -tubulina	Sigma-Aldrich	Ratón monoclonal IgG1	-	1/5000	GTU-88 T6557	
$\gamma$ -tubulina	Sigma-Aldrich	Conejo	-	1/1000	T3559	
GAPDH	Ambion	Ratón monoclonal IgG1	1/50000	-	6C5 AM4300	
Tubulina (DM1A)	Sigma-Aldrich	Ratón monoclonal IgG1	1/20000	1/1000	T9026	
GFP		Ratón monoclonal	1/1000	-		
mDia1	BD Transduction labs	Ratón monoclonal IgG1	1/100	-	51/mDia1 610848	
Myc		Conejo		1/1000		
MRTF-A	Proteintech	Conejo	1/100		21166-1-AP	
FLAG		Conejo		1/1000		
Arl13b	Proteintech	Conejo	1/1000	-	17711-1-APP	
Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa	Jackson Immuno Research		1/5000			
Anticuerpos secundarios conjugados con Alexa -488, -555, -594 o 647	Life technologies					

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo**

## **Inhibidores y otros reactivos**

Reactivo	Casa comercial
Taxol (Paclitaxel)	Sigma
Nocodazol	Sigma
Citocalasina D	Sigma
Tubacina	Enzo life sciences
Niltubacina	Enzo life sciences
TO-PRO-3	Thermo Fisher Scientific
DAPI,(4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido)	Merck

**Tabla 2. Principales reactivos químicos utilizados para diversos tratamientos durante el presente trabajo**

### **Línea celular**

Como modelo celular se ha utilizado la línea hTERT RPE-1 (ATCC CRL-4000) (en adelante RPE-1) de epitelio pigmentario humano. Estas células provienen de la línea RPE 340, procedente de células de epitelio pigmentario de una donante fallecida de traumatismo craneoencefálico. Las células RPE 340 sufren senescencia tras 50 o 60 ciclos de división. Para evitar esta limitación se inmortalizó mediante la expresión el componente catalítico de la telomerasa humana.

### **Cultivos celulares**

Las células RPE-1 se crecieron en DMEM/F12 suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (Sigma). Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La producción de cilio primario se indujo mediante la incubación con medio con suero fetal de ternera al 0,25% durante 24 h.

### **Generación de clones estables**

Se utilizaron dos plásmidos pSR-GFP/Neo (OligoEngine) que contienen sendos shARN (Brummelkamp et al., 2002) contra la secuencia de INF2 (shINF2a y shINF2b) (Andres-Delgado et al., 2010; Madrid et al., 2010) para generar clones celulares INF2 KD e INF2 KD2 de células RPE-1 con expresión silenciada de la forma INF2. Así mismo se utilizó un plásmido Mission shARN (pLKO.1 shDia1) con una secuencia complementaria al gen de DIA1 para generar clones celulares con DIA1 silenciado a partir de las células RPE-1.

Para la generación de los citados clones las células transfectadas se incubaron en presencia de 1 mg/ml de G418 en el caso de los plásmidos shINF2a y shINF2b o de 1 µg/ml de puromicina en el caso del plásmido pLKO.1 shDia1

### Plásmidos

Las construcciones de ADN que expresan la proteína INF2 entera fueron generadas en el vector pCR3.1 (Invitrogen). Las construcciones de mDia1 y mDia1  $\Delta$ N3 fusionadas a GFP (Ishizaki et al., 2001) fueron amablemente cedidos por el Dr. S. Narumiya (Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón). Los fragmentos de INF2 (FH1FH2, FH2 y  $\Delta$ Alt), mDia1 (FH2) y FMNL1 (FH2) fueron generados por PCR y clonadas en el vector pCR3.1. Las mutaciones puntuales fueron generadas usando el kit Quick Change (Stratagene). La construcción FMNL-1 GFP (Seth et al., 2006) fue generosamente donada por el Dr. M. K. Rosen (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX). Los plásmidos  $\alpha$ -TAT1 GFP (plásmido Addgene 27099) y  $\alpha$ -TAT1 D157N GFP (plásmido Addgene 27100) (Shida et al., 2010) amablemente aportados por el Dr. M. V. Nachury (Universidad de Stanford, Stanford, CA). La construcción GFP-Smoothened (plásmido Addgene 25395) (Chen et al., 2002), MRTF-A (plásmido Addgene 19846) y MRTF-A  $\Delta$ N100 (plásmido Addgene 19848) (Muehlich et al., 2008) fueron cedidos por el Dr. Phillip Beachy (Universidad John Hopkins, Baltimore, MD) y el Dr. Ron Prywes (Universidad de Columbia, Nueva York, NY). El plásmido mCherry-ER-3 fue aportado por el Dr. M. Davidson (plásmido Addgene 55041).

### Electroforesis e inmunotransferencia

Las muestras fueron preparadas para electroforesis mezclándolas con tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl, pH6,8, 4% SDS, 25% glicerol, 0,01% de azul de bormofenol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol) y hervidas 5 minutos a 95°C en un termobloque. La electroforesis se desarrolló en un gel de poliacrilamida (Bio-Rad) en condiciones desnaturizantes (10% SDS). El porcentaje de acrilamida osciló entre un 8% para la separación de proteínas de entre 100-150 kDa y 10% para proteínas de 30-60 kDa. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. Esta membrana se bloqueó con una solución de 5% leche desnatada y 0,2% Tween-20 en PBS.

Posteriormente se incubó esta membrana con una dilución de anticuerpo específico en 3% BSA en PBS durante 12 horas a 4°C. Después se lavó tres veces en PBS y se le añadió una dilución de anticuerpo secundario que reconoce el isotipo de la especie del primario y que tiene acoplada peroxidasa de rábano. Esta incubación se llevó a cabo durante media hora. Por último, se reveló añadiendo sustrato para la peroxidasa (Amersham RPN2108) cuya actividad catalítica permite generar quimioluminiscencia que fue registrada en una película autorradiográfica que fue revelada a continuación.

### **Transfección**

Para la transfección de plásmidos se utilizó Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). Previamente se diluyeron por separado el plásmido y la lipofectamina en Opti-MEM (Gibco) y tras 5 minutos se mezclaron ambas soluciones. Después de 20 minutos, la mezcla se añadió a un cultivo celular al que previamente se le había retirado el medio y realizado un lavado con Opti-MEM. Tras 4 horas se volvió a sustituir la mezcla de transfección por medio DMEM-F12.

### **Preparación de muestras para inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos y tras los correspondientes tratamientos y transfecciones, se fijaron utilizando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Después se realizó un lavado en PBS y se bloquearon los grupos aldehído añadiendo glicina 10 mM e incubando durante 5 minutos. Tras un lavado con PBS se permeabilizaron las células con metanol a -20°C durante 5 minutos. Después de un nuevo lavado en PBS se realizó un bloqueo con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos que se utilizarán durante la tinción. Para ello se añadió 3% de BSA en PBS durante 20 minutos. En el caso de tratarse de la tinción de Arl13b se utilizó Tritón X-100 al 0,2% en PBS a 4°C durante 5 minutos. Tras esto la muestra se incubó con una dilución del anticuerpo primario durante una hora. Después se lavó muestra en PBS varias veces y se añadió una dilución adecuada del anticuerpo secundario unido a fluoróforo durante 30 minutos. Los filamentos de actina se tiñeron con faloidina-647 previa permeabilización con Tritón X-100 al 0,2 % en PBS.

En el caso del análisis de la acetilación de centriolos se llevó a cabo un protocolo especial con el fin de despolimerizar el resto de los microtúbulos celulares antes de realizar la fijación. Las células en cultivo fueron tratadas con 10  $\mu$ M de Nocodazol durante 2 horas a temperatura ambiente y luego incubadas 30 minutos a 4°C. Las células fueron fijadas en metanol frío (-20°C) durante 6 minutos y después fueron teñidas como se describe anteriormente.

Las células en los cubreobjetos se fijaron al portaobjetos utilizando Fluoromont (Sigma). Se llevaron a cabo los pertinentes controles añadiendo únicamente anticuerpos primario o secundario. Las imágenes se tomaron en los siguientes microscópios (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany): equipo LSM510 unido a un microscopio Axiovert 200; Equipo LSM710 unido a un microscopio AxioImager.M2; equipo LSM710 unido a un microscopio AxioObserver. Objetivos: 63x /1.4 oil Plan Apochromat y 100x /1.3 oil Plan Neofluar de inmersión. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software de análisis FIJI sobre imágenes en formato TIFF.

### Ensayos de promotores

Para determinar la presencia de elementos de respuesta a MRTF/SRF en el gen de  $\alpha$ -*TAT1* se utilizaron ensayos de la medida de la actividad de luciferasa. Para ello se introdujeron distintos fragmentos del gen en un vector plasmídico provisto de un promotor mínimo (minP, que es una caja TATA) y del gen que codifica para la luciferasa de luciérnaga. De esta forma, la expresión de la luciferasa y su subsiguiente actividad enzimática son dependientes de la capacidad promotora de los elementos de respuesta introducidos. Para realizar este ensayo, después de la transfección se dejan las células en medio con un 0,5% de suero hasta el ensayo de estimulación, ya que la señalización propia de los factores del mismo perturbaría el resultado de las pruebas. El plásmido original en el que se clonaron los fragmentos del gen  $\alpha$ -*TAT1* es el pGL4.3.4(luc2P)/SRF-RE/Hygro (Promega; E1350) que contiene cinco secuencias CArG canónicas en tándem (5XCArG) que fueron sustituidas por las secuencias a ensayar. Como control de la eficiencia de la transfección se cotransfectó un plásmido que contiene un promotor constitutivo acoplado a la producción de la luciferasa de *Renilla*. Para determinar la actividad luciferasa se lisaron las células y al lisado se le añadió el

sustrato de la luciferasa, la luciferina, que en presencia de magnesio, se oxida a oxiluciferina. A continuación se inactivó la luciferasa y se añadió el sustrato de la enzima renilla. Esta enzima oxida su sustrato coelenterazina a coelenteramida. Ambas reacciones producen luz, que fue medida en un luminómetro (Titertek Berthold). Este ensayo se llevó a cabo con el kit Dual-luciferase reporter assay system (Promega, E1910).

Los plásmidos que se generaron contenían los fragmentos Prom1 (que posee una caja CArG a la que llamamos CArG1) y Prom2 (que posee dos cajas CArG-similares a las que llamamos CArG2 y CArG3) cuyas secuencias provienen de la zona promotora del gen. También se generó un tercer plásmido, Int1, que contenía parte de la secuencia del primer intrón del gen (que presenta una caja CArG-similar a la que llamamos CArG4). Se generaron asimismo un plásmido, CArG1-4 que contiene las cuatro cajas CArG anteriores separadas por los mismos espaciadores que tiene el plásmido original pGL4.3.4(luc2P)/SRF-RE/Hygro y un plásmido que contiene las cuatro cajas mutadas en sus nucleótidos centrales de forma que éstas sean guaninas o citosinas. Este plásmido, denominado CArG1-4m, se utilizó como control ya que no debería responder a la señalización por la vía MRTF/SRF por tener mutados los elementos de unión del complejo MRTF/SRF. Se utilizaron dos señales estimuladoras de activación. En el primer caso, tras la transfección se deja las células en un medio con bajo suero (0,5%) y a la mañana siguiente se estimularon las células con 20% de suero y después de 6 horas se realizó la medida de la actividad luciferasa. El segundo estímulo utilizado fue la co-expresión de MRTF-A  $\Delta$ 100, que es un mutante de MRTF de delección que constitutivamente activo pues migra al núcleo también sin necesidad de estímulo. En este caso se incubaron las células con 0,5% de suero la noche siguiente a la de la transfección y se determinó la actividad luciferasa un día más tarde.

### **RT-PCR cuantitativa**

El ARN total obtenido de células hTERT RPE-1 tratadas como se indica en cada caso fue purificado utilizando el kit RNeasy (Qiagen, 74104). Los niveles de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 se determinaron utilizando el kit Super Script III First-Strand Syntesis SuperMix (Life Technologies, PN 11752250) y el qPCT FAST Sybr Green PCR Master Mix (Applied



Biosystems, PN 4367659) en un equipo ABI 7900HT. Los resultados fueron normalizados respecto a los niveles del ARN mensajero de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los datos se analizaron con el programa GenEX. Los oligonucleótidos para amplificar el mRNA de  $\alpha$ -TAT1 fueron  $\alpha$ -TAT1f (5'-GGCGAGAACTCTTCCAGTAT-3') y  $\alpha$ -TAT1r (5'-TTGTTACCTGTGGGACT-3') (Shida et al., 2010)

### **Medida de la relación de G-/F-actina**

La relación G-/F-actina se determinó utilizando un kit comercial (Cytoskeleton, Inc., BK037). Para ello se lisaron las células en un tampón estabilizador de actina polimérica y se incubaron 10 minutos a 37°C. Tras una primera centrifugación a baja velocidad (350 xg) durante 5 minutos para sedimentar las células no lisadas, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a alta velocidad (100.000 xg) a 37°C durante 1 h para sedimentar la actina filamentosa. Se recogió el sobrenadante que contiene la actina soluble y al pellet se le añadió solución de despolimerización de actina y se incubó durante 1 h en hielo para que el proceso de despolimerización tuviera lugar. Las muestras se sometieron a inmunotransferencia siendo detectadas con un anticuerpo específico para actina. Finalmente, la película autorradiográfica fue analizada con Image J para calcular los niveles relativos de G- y F-actina.

# Resultados

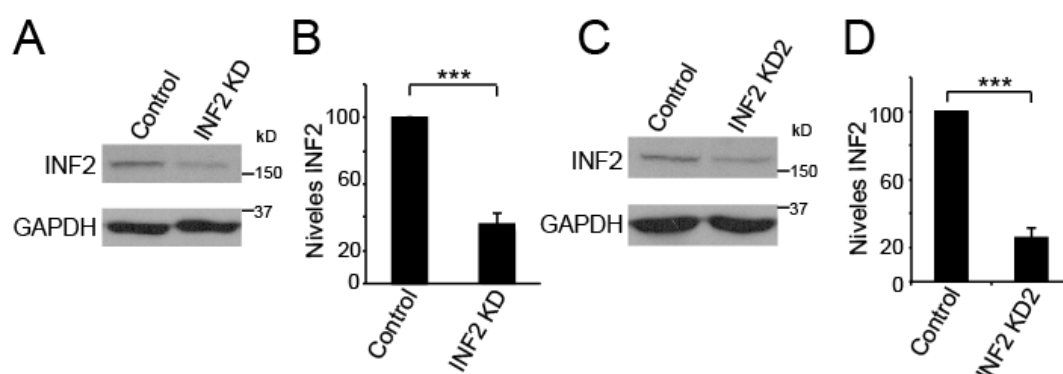
**El silenciamiento de INF2 reduce dramáticamente la acetilación de microtúbulos**

La acetilación de la lisina 40 de la  $\alpha$ -tubulina es la más estudiada de todas las modificaciones químicas que son llevadas a cabo por diferentes enzimas sobre el citoesqueleto microtubular, y que establecen una compleja red de cambios postraduccionales que dividen el conjunto de microtúbulos celulares en diversos subtipos funcionales. A todo este complejo sistema de modificaciones químicas y su correspondencia funcional de los denomina “El código de la tubulina”, siendo el objetivo de la presente tesis desentrañar una pequeña parte de su regulación.

Para la realización de este estudio se ha elegido la línea celular hTERT RPE-1. Se escogió esta línea celular por presentar gran diversidad estructuras estables de microtúbulos que suelen ser dianas de las modificaciones postraduccionales de nuestro interés y que facilitan su observación. Son además un modelo muy utilizado para el estudio de cilio primario por generar estos orgánulos en respuesta a la ausencia de suero en el medio de cultivo.

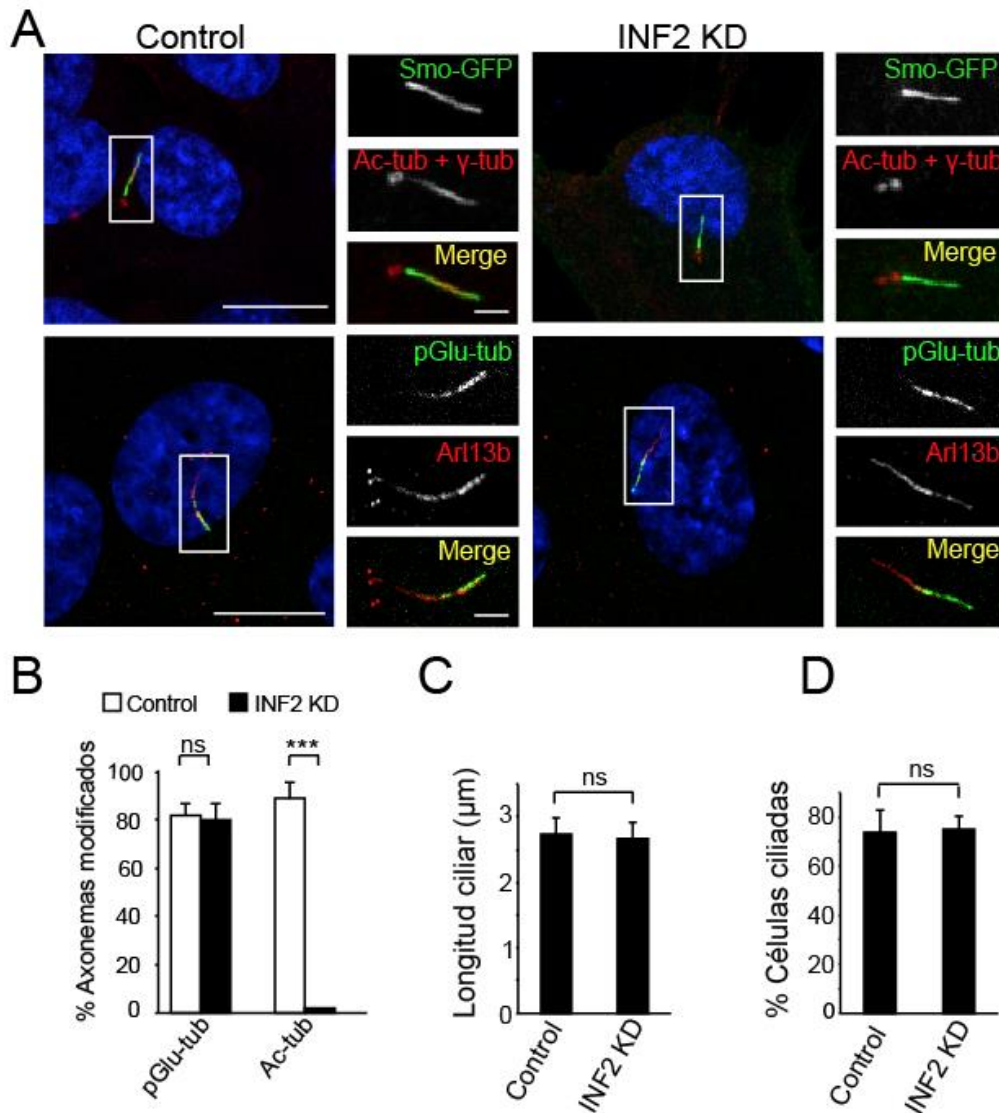
Entre las principales estructuras formadas por microtúbulos se encuentran el cilio primario, los centriolos, los puentes formados durante la citocinesis en la división celular y la red de microtúbulos pericentrosomales observados en interfase. Todas estas estructuras presentan un nivel alto de acetilación en el residuo K40 de la  $\alpha$ -tubulina. Sin embargo, la adición de otros grupos como cadenas de glutamatos o poliglutamilación solo se da en microtúbulos del axonema ciliar y el puente de citocinesis.

Para estudiar la contribución de la formina INF2 en la aparición de ambas modificaciones postraduccionales de microtúbulos se generaron clones celulares estables a partir de células RPE1 que expresaban de manera estable un shARN específico para silenciar la expresión de la proteína INF2 y que se denominaron células INF2 KD (Fig. 7). Se analizaron dos clones celulares obtenidos con dos shARN diferentes contra el mRNA de INF2 y que generaron un descenso aproximado del 75% de la cantidad de INF2.

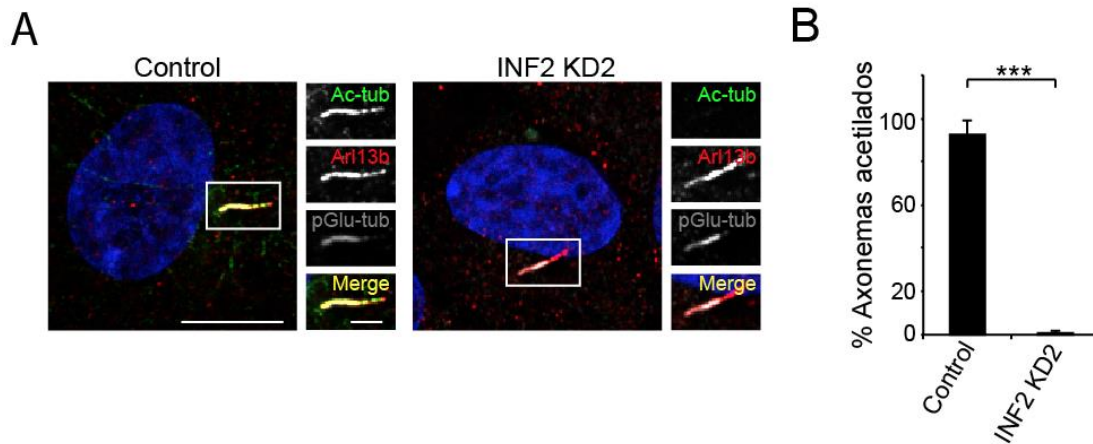


**Figura 7. Generación de líneas estables de RPE1 silenciadas para INF2.** Se generaron dos clones de células RPE1 a partir de la transfección de shARN INF2a y shARN INF2b y su posterior selección con G418. Se muestran los resultados de una inmunotransferencia realizada con lisados totales de las células control y de ambos clones silenciados, INF2 KD e INF2 KD2 (A y C). Los histogramas representan la cuantificación de los niveles de INF2 (B, D). B y D muestran el resultado de tres experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

En primer lugar se estudió la acumulación de modificaciones postraduccionales en células silenciadas para INF2 en las que se había estimulado la ciliogénesis. Se observó que la falta de INF2 reducía dramáticamente el número de axonemas acetilados (Fig. 8 A y B y Fig. 9 A y B). Estos orgánulos fueron identificados mediante la transfección del marcador de la membrana ciliar Smo-GFP que nos permitía así visualizar la totalidad de las estructuras ciliares. Por otra parte, la poli-glutamilación de tubulina no se vio afectada en las células INF2 KD, lo que indicó que la disminución en la acetilación de  $\alpha$ -tubulina no era debida a un descenso global de todas las modificaciones postraduccionales del axonema ciliar (Fig. 8 A y B y Fig. 9 A y B). Para visualizar la membrana ciliar en las células teñidas para tubulina poli-glutamilada, las células se tiñeron con anticuerpos contra la GTPasa Arl13b. Además se observó que ni la pérdida de acetilación de la  $\alpha$ -tubulina, como ya fue descrito con anterioridad (Shida et al., 2010), ni la falta de INF2 afectaban al porcentaje de células ciliadas ni a la longitud ciliar (Fig. 8 C y D).

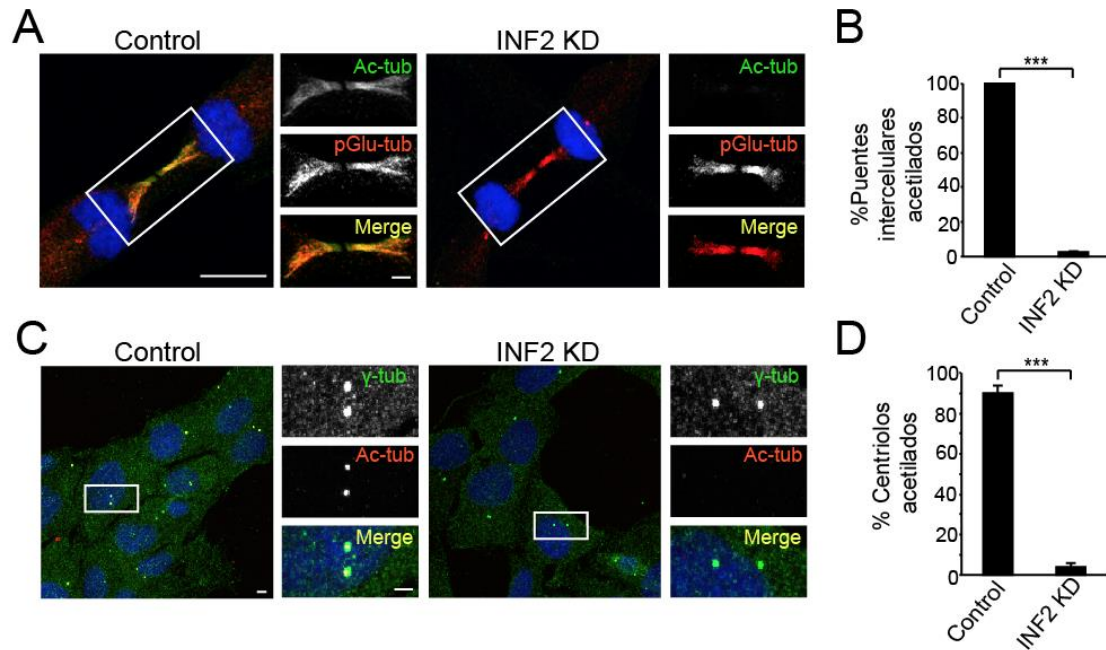


**Figura 8. El silenciamiento de INF2 redujo la acetilación del axonema ciliar pero no afectó a su poliglutamilación, longitud de los cilios o porcentaje de células ciliadas.** (A) Se utilizaron células fijadas tanto control como INF2 KD para inmunodetectar  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -tub) y tubulina acetilada (Ac-tub) o tubulina poliglutamilada (pGlu-tub). Para detectar dichas modificaciones en los axonemas ciliares, los cilios se marcaron mediante la transfección del marcador ciliar Smo-GFP o con anticuerpos frente a Arl13b, tal y como se indica. (B) El porcentaje de axonemas positivos para cada una de las modificaciones en células control e INF2 KD fue cuantificado y representado en forma de histograma (n= 300-450 células por punto experimental). (C) No se observó cambio en la longitud ciliar en células INF2 KD respecto a las células control. (D) El porcentaje de células ciliadas no varió entre las células control y las INF2 KD n= 350-400 células por punto experimental). En A los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala en visión panorámica 10  $\mu$ m y en ampliaciones 2  $\mu$ m. En B, C y D los histogramas muestran el resultado de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).



**Figura 9. La acetilación del axonema también está inhibida en las células INF2 KD2.** (A) La membrana ciliar se tiñó con el anticuerpo Arl13b, y el axonema para detectar acetilación o poliglutaminación. (B) Se observa que en la línea INF2 KD2 descendió el porcentaje de axonemas acetilados (n= 300-400 células por punto experimental). En A los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala de la visión panorámica 10  $\mu$ m y en las ampliaciones 2  $\mu$ m. B muestra el resultado de tres experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

El mismo descenso en la acetilación de microtúbulos se observó en los puentes de citocinesis de las células INF2 KD (Fig. 10 A y B). La poliglutamilación de la tubulina permaneció inalterada también en estas estructuras. La acetilación de los microtúbulos centriolares se estudió utilizando el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos y que se basa en la despolimerización de las estructuras microtubulares con el fin de que la tinción para la tubulina acetilada no oculte el marcaje de los centriolos. En estas condiciones se observó, en concordancia con los resultados anteriores, que la acetilación de los microtúbulos centriolares disminuyó de forma drástica en las células INF2 KD (Fig. 10 C y D).

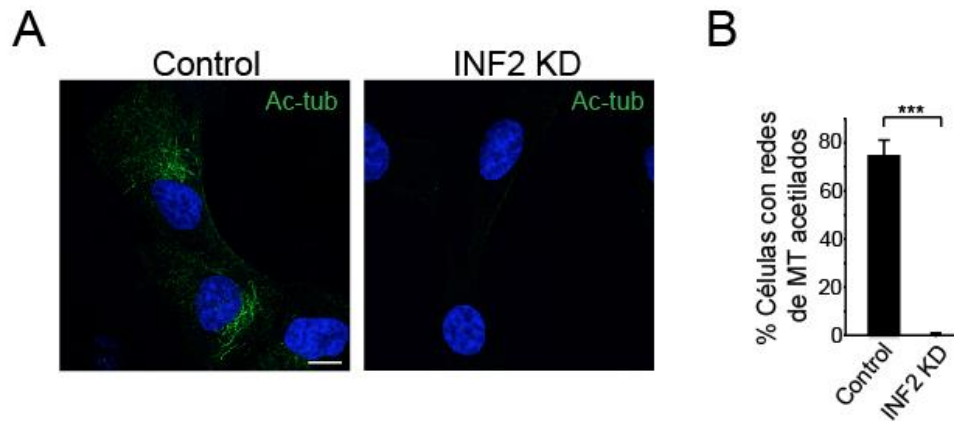


**Figura 10. El silenciamiento de INF2 inhibió la acetilación de los microtúbulos del puente intercelular formado durante la citocinesis y la de los centriolos.** Las células INF2 KD y control se tiñeron para tubulina acetilada y para tubulina poliglutaminada (A). Se muestran solo células en citocinesis. (B) Cuantificación de los puentes intercelulares acetilados en las células INF2 KD y control (n= 300-400 células por punto experimental). (C,D) Se realizó el protocolo de despolimerización de microtúbulos descrito en Materiales y métodos y se tiñeron las células para  $\gamma$ -tubulina y tubulina acetilada (C). Cuantificación del número de centriolos acetilados en las células control e INF2 KD (n= 300-400 células por punto experimental). En A y en C se tiñeron los núcleos con TO-PRO. Barras de escala 10  $\mu$ m en la pánoramica y 2  $\mu$ m en las ampliaciones. Los histogramas de B y D representan el resultado de tres experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

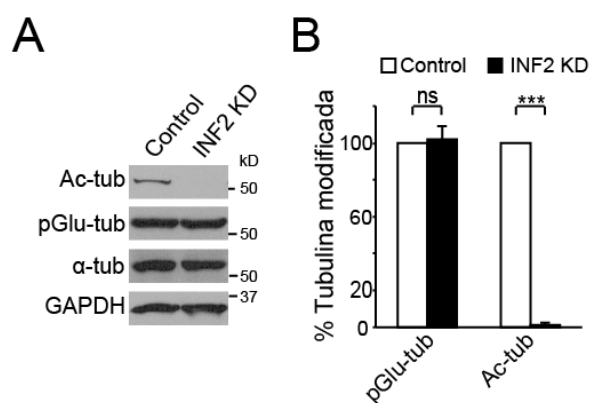
Por último se estudió la acetilación en la red de microtúbulos pericentrosomales, observándose un descenso de acetilación igualmente acusado (Fig. 11 A y B).

En las estructuras examinadas hasta ahora es relativamente sencillo visualizar por microscopía de fluorescencia los cambios en la existencia de modificaciones químicas de la tubulina. Como complemento a este estudio el análisis de extractos proteicos por electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa seguidas de la inmunodetección de la tubulina acetilada, proporciona además un dato global y cuantitativo. Este análisis confirmó el descenso de la cantidad de tubulina acetilada y que los niveles de tubulina poli-glutamilada permanecían inalterados en las células silenciadas para INF2 (Fig. 12 A y B). Como controles del contenido proteico de los

extractos se analizaron los niveles totales de  $\alpha$ -tubulina y de la enzima metabólica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.



**Figura 11. Las células silenciadas para INF2 carecen de redes microtubulares acetiladas.** (A) Se tiñeron las células para tubulina acetilada y (B) se cuantificó el porcentaje de células que presentan redes de microtúbulos acetilados. (n= 300-350 células por punto experimental). En A el núcleo de las células está teñido con TO-PRO. Barra de escala 10  $\mu$ m. El histograma de B representa el resultado de tres experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

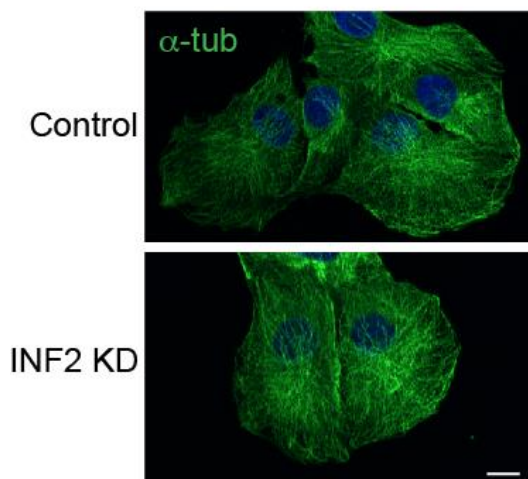


**Figura 12. Análisis de la acetilación de la tubulina por inmunotransferencia en células INF2 KD.** (A) Los extractos totales de ambos tipos de células se analizaron por inmunotransferencia. y (B) se cuantificó la cantidad de cada modificación y se relativizó a la cantidad de GAPDH. El histograma de B representa los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

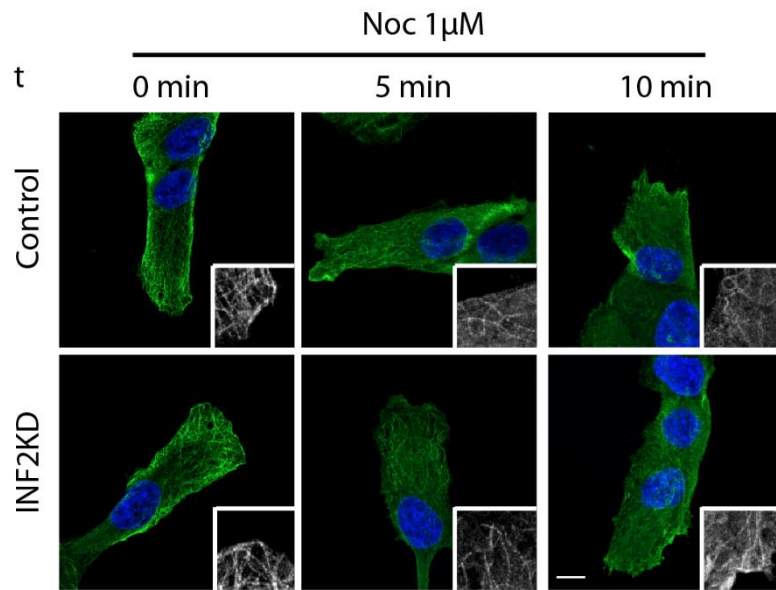


### La inhibición de la acetilación de microtúbulos debido al silenciamiento de INF2 no es debido a un descenso en su estabilidad

Puesto que uno de los modelos más establecidos sobre el funcionamiento de  $\alpha$ -TAT1 implica que esta enzima accede de manera no dirigida a todos los microtúbulos y que solo aquellos que son estables acumulan esta modificación química al tener una vida media más larga, la observación de que los microtúbulos están mucho menos acetilados en las células con expresión deficiente de INF2 podría explicarse en base a un descenso en su estabilidad y, por lo tanto, a un aumento en el recambio entre la tubulina polimerizada y la monomérica. Esta hipótesis concordaría con el papel ya establecido de las forminas como elementos de unión y estabilización de microtúbulos (Gaillard, J. et al., 2011). Sin embargo en las células INF2 KD no se observó un alteración evidente de la distribución de microtúbulos (Fig. 13) y estos no mostraron una resistencia menor a tratamiento con nocodazol, agente despolimerizador de microtúbulos, respecto a los de las células control como debería ocurrir en el caso de que fueran significativamente menos estables (Fig. 14).

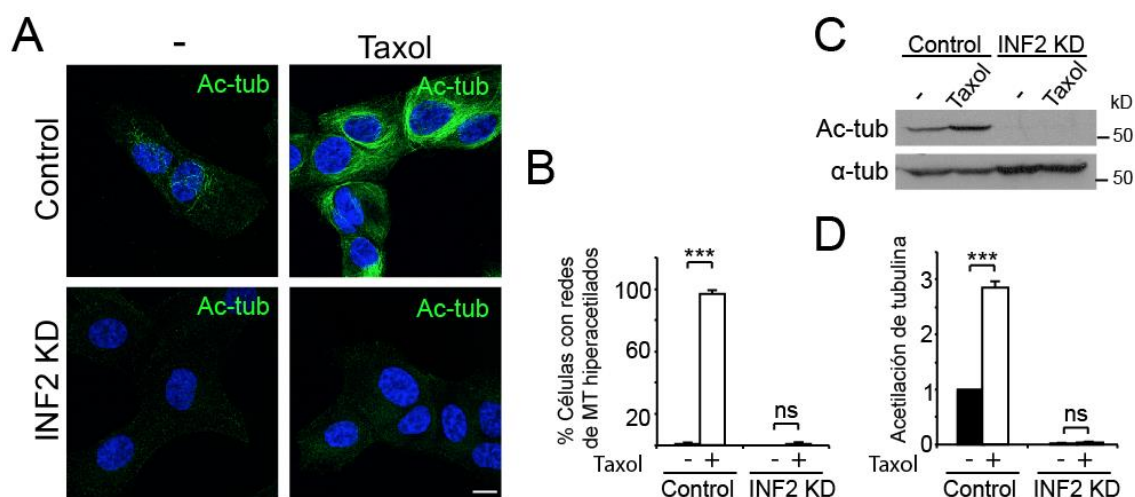


**Figura 13. El silenciamiento de INF2 no produjo defectos detectables en el citoesqueleto de tubulina.** Células control e INF2 KD se tiñeron con anticuerpo frente a  $\alpha$ -tubulina. Los núcleos de estas células fueron teñidos con TO-PRO. Barra de tamaño 10  $\mu$ m.



**Figura 14. El silenciamiento de INF2 no afectó a la resistencia de los microtúbulos frente a la despolimerización producida por nocodazol.** Las células control y las INF2 KD fueron tratadas con nocodazol durante los tiempos indicados y se tiñeron para  $\alpha$ -tubulina. Los núcleos células fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

De forma coherente con estos resultados se observó que la estabilización de microtúbulos mediante la adición de Paclitaxel (Taxol) no revirtió el descenso de acetilación de tubulina, determinado mediante el porcentaje de células que resultaban hiperacetiladas tras el tratamiento. Como criterio de hiperacetilación se marcaron como positivas las células que superasen en tres veces la intensidad media de la acetilación de los microtúbulos de las células control (Fig. 15 A y B). El análisis por inmunotransferencia confirmó la falta de acetilación de tubulina en respuesta al tratamiento con taxol de las células INF2 KD, mientras que se sí que se observó un aumento significativo en el caso de las células control (Fig. 15 C y D).



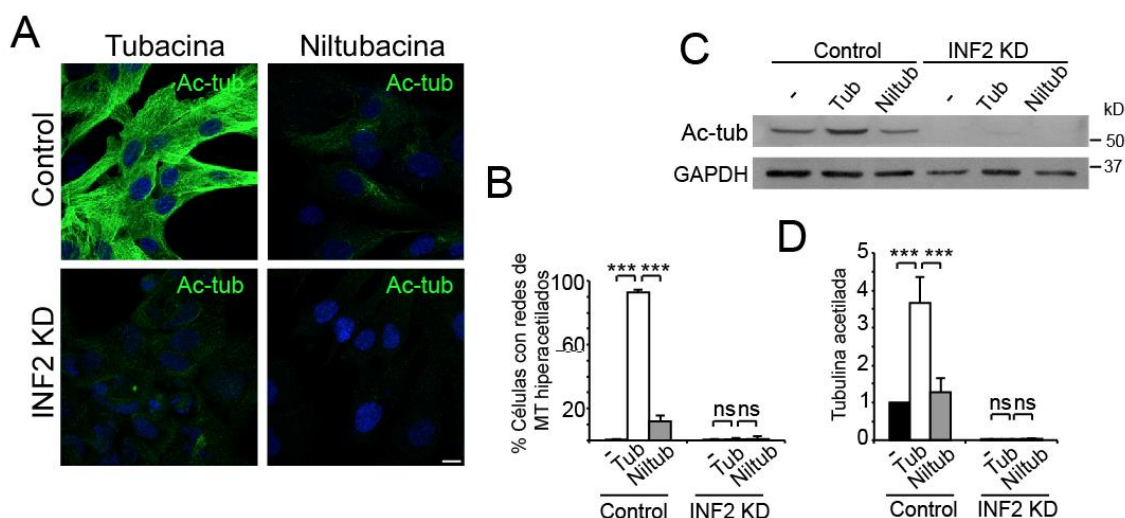
**Figura 15. La falta de acetilación de tubulina en las células INF2 KD no es debida a un descenso en la estabilidad de los microtúbulos.** (A-D) Las células control y las INF2 KD fueron tratadas con taxol 2,5  $\mu$ M o con vehículo durante 2 h y luego (A) fueron fijadas y teñidas para tubulina acetilada. (B) Cuantificación del número de células con microtúbulos hiperacetilados ( $> 3$  veces que en las células control) ( $n = 420$ -450 células por punto experimental). (C) Los extractos de estas células se analizaron por inmunotransferencia para detectar la tubulina acetilada y la  $\alpha$ -tubulina total. (D) Cuantificación de la acetilación de la tubulina. En A los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los histogramas B y D representan los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que la diferencia en la acetilación de microtúbulos de las células INF2 KD respecto a la de las células control no se debe a una menor estabilidad de sus microtúbulos.

#### **La inhibición de la desacetilación de microtúbulos no recupera la acetilación de tubulina en las células INF2 KD**

Otra posibilidad que justificaría el descenso global en la acetilación de tubulina sería que el déficit en los niveles de INF2 se tradujera en una actividad exacerbada de la desacetilasa de microtúbulos HDAC6. La existencia de un inhibidor específico, la tubacina, de esta desacetilasa nos permitió ensayar esta posibilidad. Como control se utilizó un análogo estructural, la niltubacina, que posee una capacidad inhibitoria de HDAC6 mucho menor. Se comprobó tanto a través del conteo de células con microtúbulos hiperacetiladas mediante microscopía (Fig. 16 A y B) como por ensayos de inmunotransferencia que los niveles de tubulina acetilada no se recuperaban tras el tratamiento de las células INF2 KD con tubacina mientras que estos aumentaban en las

células control (Fig. 16 C y D). Estos resultados descartan la posibilidad de que la falta de acetilación de tubulina en las células INF2 KD se debiera a un incremento de la actividad de HDAC6 inducida por la falta de INF2.

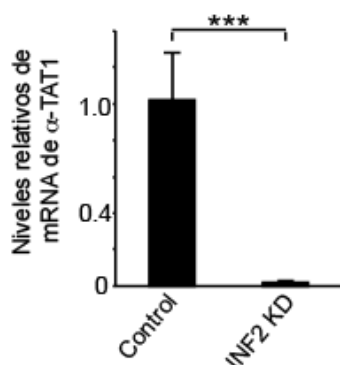


**Figura 16. La ausencia de acetilación de los microtúbulos de las células INF2 KD no es debida a una mayor actividad desacetilasa.** (A-D) Las células control y las INF2 KD fueron tratadas con tubastatina o niltubastatina 10  $\mu$ M durante 8 h. (A) Después fueron fijadas y teñidas con anticuerpo frente a tubulina acetilada. (B) Cuantificación del porcentaje de células con hiperacetilación de microtúbulos (n= 350-450 células por punto experimental). (C) Los extractos celulares fueron analizados por inmunotransferencia con anticuerpos frente a la tubulina acetilada. (D) Cuantificación de los niveles de tubulina acetilada tras su normalización frente a la cantidad de GAPDH. En A los núcleos de las células fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los histogramas B y D representan los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### La disminución de la acetilación de tubulina en las células INF2 KD se debe a un descenso en los niveles de $\alpha$ -TAT1

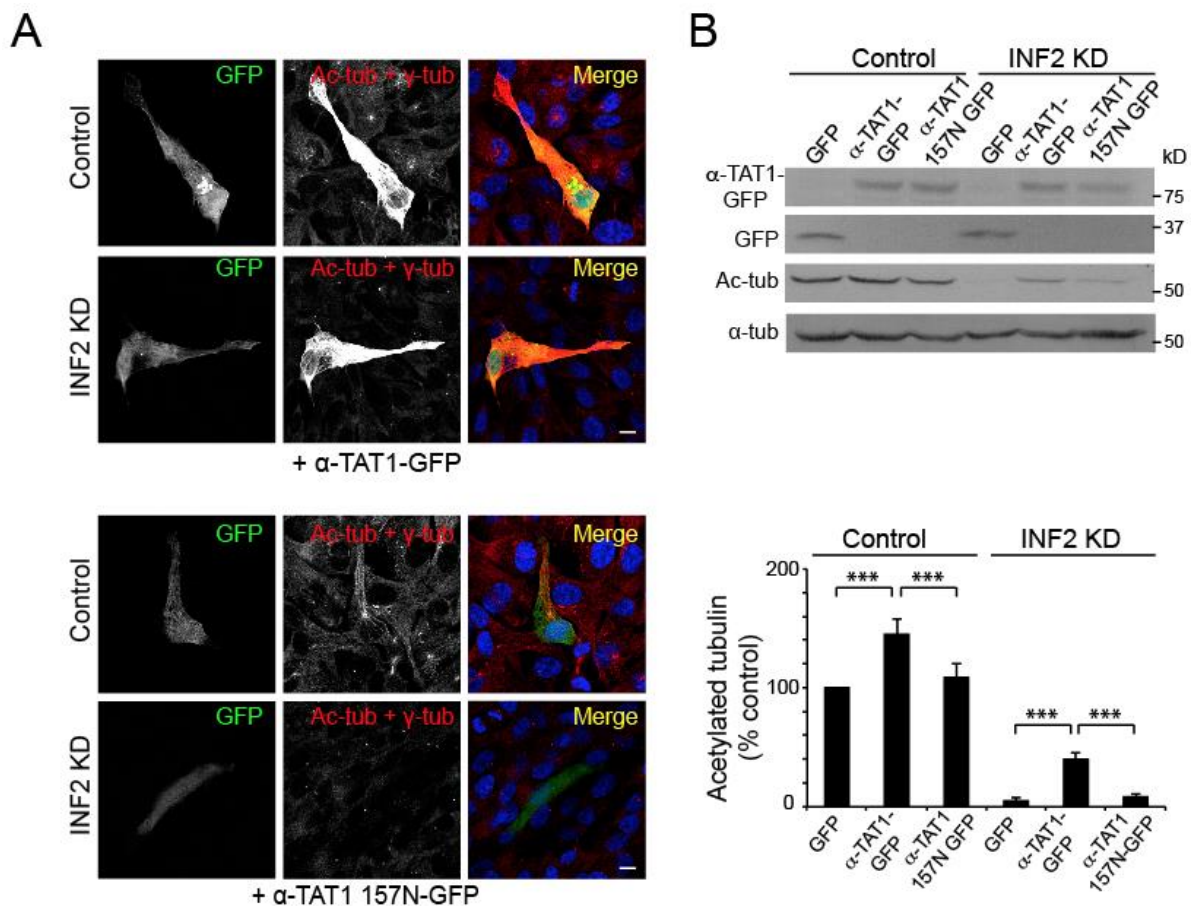
Puesto que el efecto del silenciamiento de INF2 sobre la acetilación de microtúbulos no parece deberse ni a una disminución de la estabilidad de los microtúbulos ni a un aumento de su desacetilación, se analizó la posibilidad de la falta de la enzima acetiladora  $\alpha$ -TAT1 en las células INF2 KD. Puesto que no existe ningún anticuerpo disponible que reconozca la proteína  $\alpha$ -TAT1 endógena, se analizaron los niveles de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 mediante RT-PCR, utilizando los mismos oligonucleótidos cebadores descritos en Shida et al (2010). Cuando se compararon con respecto a las células control, se observó que los niveles de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 eran prácticamente

indetectables en las células INF2 KD. (Fig. 17). Este resultado sugiere fuertemente que es la falta de  $\alpha$ -TAT1 la responsable de la ausencia de acetilación de tubulina en las células INF2 KD.



**Figura 17. Las células INF2 KD tienen niveles prácticamente indetectables de mRNA para  $\alpha$ TAT1.** Se realizó una retrotranscripción del ARN total de las células INF2 KD y control y los niveles mRNA de  $\alpha$ TAT1 se analizaron mediante RT-PCR. El histograma representa los de mRNA  $\alpha$ TAT1 niveles relativizados a los de las células control. El resultado mostrado en el histograma corresponde a tres experimentos independientes. (\*\*\*, $p > 0,001$ )

Para comprobar que  $\alpha$ -TAT1 es el único elemento necesario del proceso de acetilación que no está presente en las células INF2 KD, se analizó la acetilación de los microtúbulos en células INF2 KD que expresaban de forma transitoria la proteína de fusión  $\alpha$ -TAT1-proteína fluorescente verde ( $\alpha$ -TAT1-GFP), utilizando como control la transfección del mutante  $\alpha$ -TAT1 157N-GFP en el que el ácido aspártico de la posición 157, fundamental para la funcionalidad del centro activo de la enzima ha sido mutado a asparagina. Se observó tanto por microscopía de fluorescencia (Fig. 18 A) como por inmunodetección que la expresión de  $\alpha$ -TAT1 incrementó notablemente la acetilación en las células INF2 KD (Fig. 18 B) mientras que no se detectó ningún cambio significativo por la expresión de  $\alpha$ -TAT1 157N. Estos resultados permiten concluir que  $\alpha$ -TAT1 es el único elemento imprescindible del proceso de acetilación que falta en las células INF2 KD.



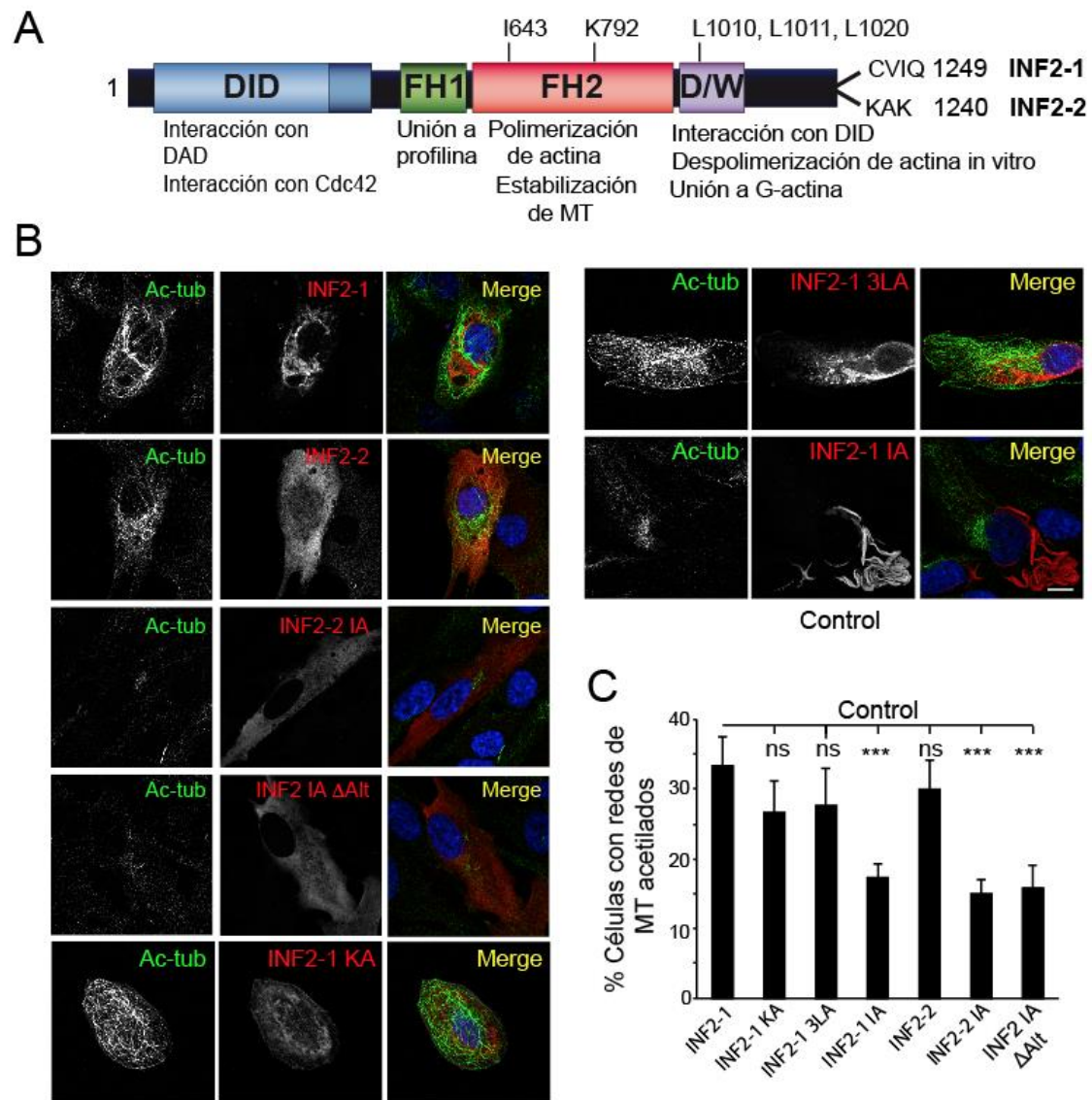
**Figura 18. La expresión de  $\alpha$ TAT1 recuperó la acetilación de los microtúbulos en las células INF2 KD.** Las células control y las INF2 KD fueron transfectadas de manera transitoria con  $\alpha$ TAT1-GFP o  $\alpha$ TAT1-147N-GFP y (A) fijadas y teñidas para  $\gamma$ -tubulina y tubulina acetilada con el mismo color o (B, panel superior) preparadas para inmunotransferencia. Los niveles de acetilación de tubulina de estas células fue determinada mediante la intensidad de señal y relativizada a la de GAPDH (B, panel inferior). En A los núcleos de las células fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. El histograma representa los resultados de tres experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### INF2 requiere su actividad polimerizadora de actina para promover la acetilación de tubulina

Tanto la expresión de la isoforma INF2-1, que presenta una secuencia aminoacídica en su extremo C terminal que es modificada covalentemente mediante la adición de un grupo farnesilo que ancla la proteína a la membrana del retículo endoplásmico, como la isoforma INF2-2, que se encuentra libre en el citoplasma celular (Fig 19A) (Madrid et al., 2010; Ramabhadran et al., 2011), en las células control aumentaron de forma significativa el porcentaje de células con hiperacetilación de la red microtubular.

Se sabe que el fragmento FH1-FH2 de diversas forminas es capaz de inducir la acetilación de los microtúbulos (Thurston et al., 2012) . A su vez el dominio FH2 es el dominio catalítico responsable de la polimerización de actina, proceso en el que colabora también el dominio FH1 mediante la unión de profilina, que aporta los monómeros de actina para la polimerización (Goode and Eck, 2007). Por lo tanto, parecía interesante tratar de discernir si la capacidad inductora de la acetilación de los microtúbulos de INF2 reside en su actividad polimerizadora de actina. Para ello se sobreexpresaron distintos mutantes de INF2 con mutaciones en sus dominios de interacción o de polimerización de actina (Fig. 19) En primer lugar se ensayó el efecto de la mutación K792A (INF2-1 KA) (Bartolini et al., 2008; Xu et al., 2004), que tiene mutada su lisina 792 por una alanina. El residuo equivalente es fundamental para la actividad polimerizadora de actina de la formina Bnp1 de levaduras, al contrario que en la proteína humana, dónde muestra un efecto de reducción de polimerización de actina mínimo (Ramabhadran et al., 2012). Como se espera por su capacidad polimerizadora de actina la expresión de esta proteína produjo un porcentaje similar de células hiperacetiladas que la expresión de la forma intacta (Fig. 19 B y C). Asimismo la mutación 3L1010, 1011, 1020A (INF2-1 3LA) que inhibe la capacidad despolimerizadora de actina de INF2 ensayada *in vitro* (Chhabra and Higgs, 2006) no tuvo efecto significativo sobre la capacidad de INF2 de promover la hiperacetilación de los microtúbulos (Fig. 19 B y C). Sin embargo la mutación I643A que bloquea la capacidad polimerizadora de actina de INF2 (Ramabhadran et al., 2012) en INF2-1 IA e INF2-2 IA y en INF2 IA  $\Delta$ Alt, que es un mutante con la sustitución IA y con la delección de los amino ácidos distintivos de las dos isoformas, hace que INF2 genere un porcentaje menor de células hiperacetiladas (Fig. 19 B y C).

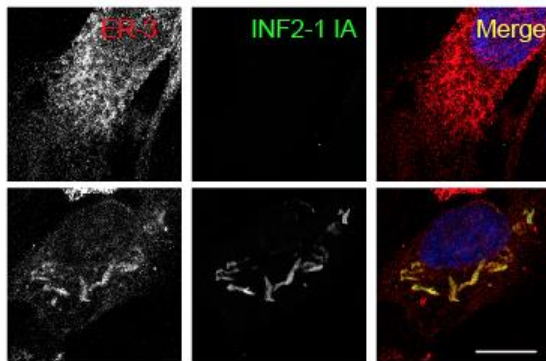




**Figura 19. Las formas de INF2 que conservan la actividad polimerizadora de actina inducen acetilación de microtúbulos más eficientemente que en las que esta actividad está bloqueada.** (A) Representación esquemática de INF2 en la que aparecen representados sus dominios junto a sus principales funciones y las mutaciones que se analizan en este trabajo. Aparece así mismo la parte carboxilo terminal que diferencia a ambas isoformas y hace que INF2-1 se una a membrana del retículo endoplasmático. (B) Las células RPE1 fueron transfectadas con cada una de las isoformas de INF2 y con los mutantes indicados. Las células fueron fijadas, y teñidas con anticuerpos que reconocen INF2 o tubulina acetilada. (C) El porcentaje de células hiperacetiladas fue cuantificado (n= 300-400 células por punto experimental). En A los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. El histograma C es la representación de los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Aunque el mutante INF2-1 I643A tuvo el mismo efecto, se acumuló en estructuras membranosas del retículo endoplasmático, por lo que en este caso la interpretación podría ser menos clara (Fig. 20).

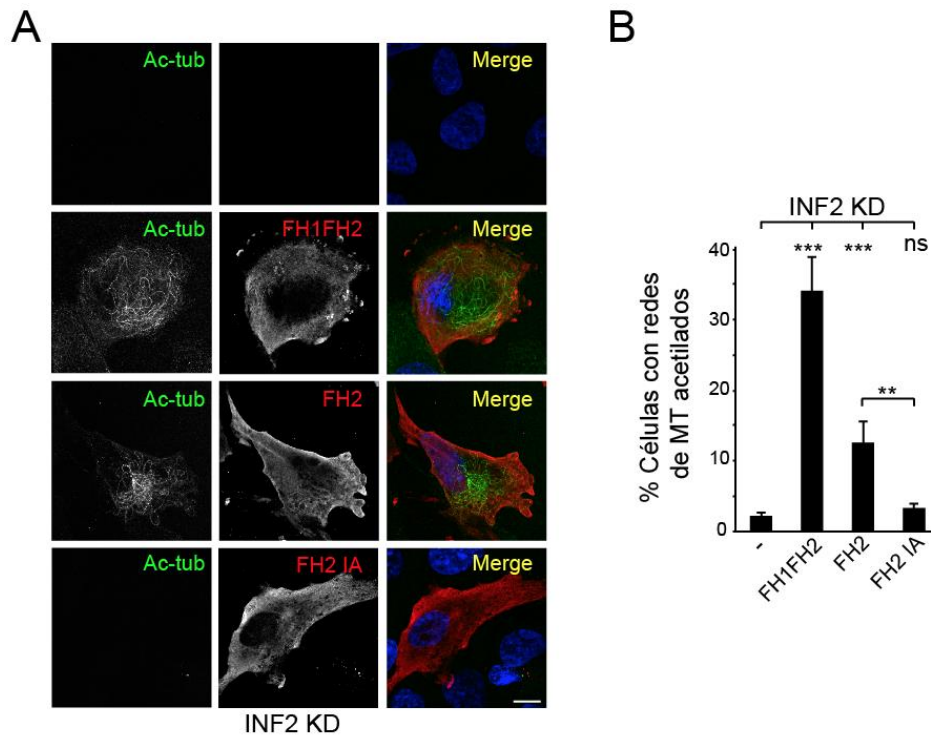




**Figura 20. El mutante INF2-1 IA se retiene en el retículo endoplasmático.** Se cotransfectaron células control con m-Cherry-ER3 e INF2-1 IA y se tiñeron para INF2 exógena. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

### **La expresión de fragmentos de INF2 con actividad polimerizadora de actina recupera la acetilación de los microtúbulos en las células INF2 KD**

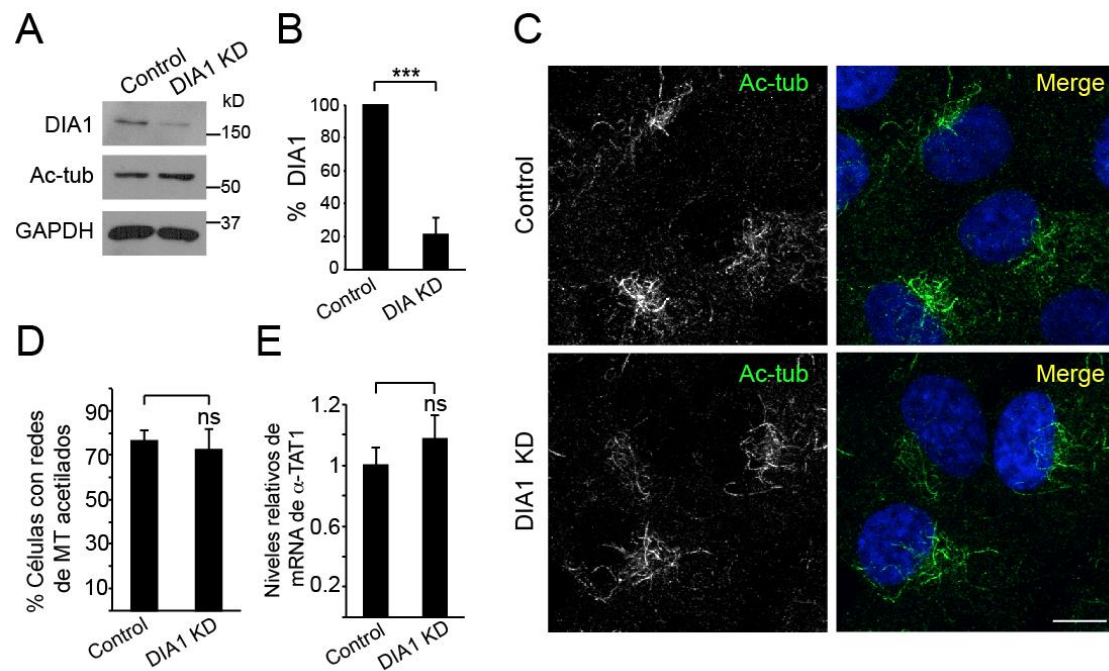
Para tratar de revertir el defecto de acetilación de tubulina producido por la falta de INF2 en las células INF2 KD se expresaron distintos fragmentos de INF2 con capacidad nucleadora de actina (FH1FH2 y FH2) o con ésta bloqueada por mutación (FH2 IA). La expresión de INF2 FH1-FH2 y de INF2 FH2 recuperaron la acetilación de microtúbulos acetilados y esta recuperación resultó en consonancia con la capacidad polimerizadora de cada fragmento ya que el fragmento FH1-FH2 posee el dominio FH1 de unión a profilina que contribuye de forma importante a la que la polimerización de actina por el dominio FH2 sea más eficiente que cuando este se expresa en solitario (Goode and Eck, 2007). Es de destacar que la mutación IA en el dominio FH2 bloqueó la capacidad de inducir la acetilación de tubulina (Fig. 21 A y B).



**Figura 21. La expresión de dominios FH2 con capacidad polimerizadora de actina recupera la acetilación de los microtúbulos en las células INF2 KD.** (A) Se expresaronn diferentes fragmentos de INF2 con y sin la mutación IA y (B) se determinó el porcentaje de células con redes de microtúbulos acetilados (n=300-400 células por punto experimental). Los núcleos de A fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. El histograma de B representa los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### El silenciamiento de la formina DIA1 no produce un descenso en la acetilación de microtúbulos celulares

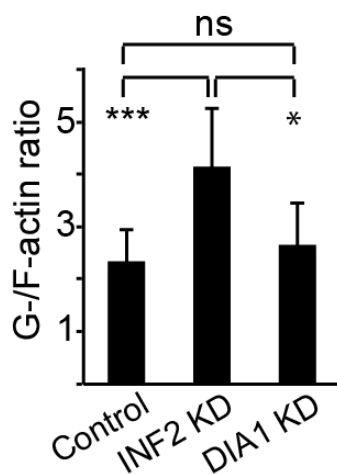
Para investigar si el efecto del silenciamiento de INF2 sobre la acetilación de tubulina es específico de INF2, o por el contrario es un efecto general de todas las forminas, analizamos la formina humana DIA1, que es la ortóloga de la formina de ratón mDia1. El silenciamiento de DIA1 mediante la generación de un clon celular estable que expresa un shARN específico para DIA1 no produjo ningún descenso apreciable de acetilación de microtúbulos, ensayado tanto por inmunotransferencia (Fig. 22 A y B) como por microscopía de fluorescencia (Fig. 22 C y D). Congruentemente con este resultado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 en estas células con respecto a las células control (Fig. 22 E).



**Figura 22. El silenciamiento de DIA1 no afectó a la acetilación de microtúbulos.** (A) Se analizaron por inmunotransferencia los extractos de las células control y el clon que expresa el shARN específico para DIA1 y (B) se representan los niveles de DIA1 respecto a la cantidad de GAPDH. (C) Las mismas células se fijaron y prepararon para inmunofluorescencia inmunodetectando tubulina acetilada y se cuantificó el porcentaje de células con redes de microtúbulos acetilados (D) (n= 300-400 células por punto experimental). (E) A partir de extractos de ARN de las células control y las células DIA1 KD se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de  $\alpha$ TAT1. Los núcleos celulares en (C) han sido teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los histogramas de (B, D y E) muestran los resultados de tres experimentos independientes (ns, no significativo, \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

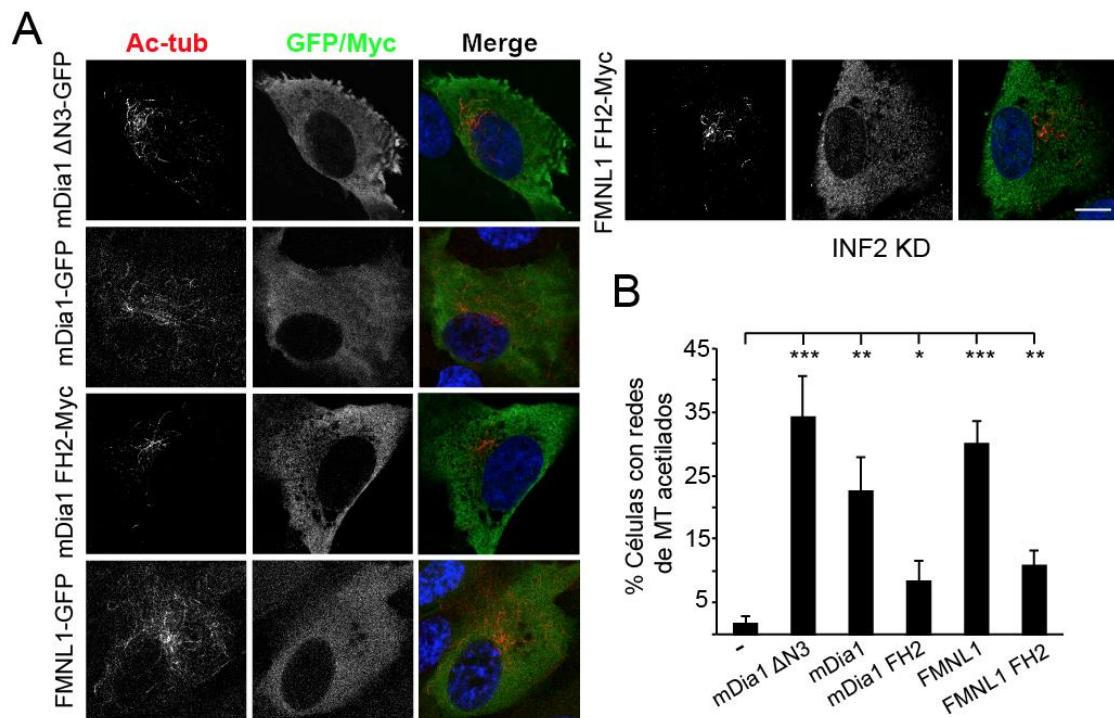
### El silenciamiento de INF2 altera la relación G-/F-actina

La cantidad de G- actina (actina globular monomérica) y F-actina (actina filamentosa polimérica) en las células control, INF2 KD y Dia1 KD fue evaluada mediante un ensayo que permite separarlas para luego inmunodetectarlas y cuantificar sus niveles. Se encontró que la relación G/F-actina estaba notablemente incrementada en caso de las INF2 KD respecto a las células control y las células DIA1 KD (Fig. 23). Este resultado indica la falta de INF2 pero no la de cualquier forma altera la relación G-/F-actina.



**Figura 23. El silenciamiento de INF2, pero no el de DIA1, cambia la relación G-/F-actina.** Se determinó la relación de G-/F-actina de las células control, INF2 KD y DIA1 KD. El histograma muestra los resultados de cinco experimentos independientes (ns, no significativo, \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Para comprobar si, además de INF2, la sobreexpresión de otras forminas era capaz de restaurar la acetilación en las células INF2 KD se expresaron en estas células las construcciones mDia1, mDia1  $\Delta$ N3, que es una forma constitutivamente activa por carecer de la secuencia amino terminal autoinhibitoria, el dominio FH2-de mDia1, la formina completa FMNL1 y el dominio FH2 de FMNL1. En todos los casos se observó acetilación de microtúbulos en las células INF2 KD y los niveles de acetilación correlacionaban con la mayor o menor actividad polimerizadora de actina de las proteínas expresadas (Fig. 24 A y B).



**Figura 24. La sobreexpresión de DIA1 y FMNL1 inducen la acetilación de los microtúbulos en las células INF2 KD.** (A) Se expresaron los fragmentos mDia1  $\Delta$ N3-GFP, mDia1-GFP, mDia1 FH2 Myc, FMNL1-GFP y FMNL1 FH2-Myc y se fijaron las células para la inmunodetección de la tubulina acetilada y visualizando GFP o detectando el epítipo Myc. (B) Se cuantificó el porcentaje de células que presentan redes de microtúbulos acetilados (n= 300-400 células por punto experimental). Los núcleos en (A) fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. El histograma de (B) representa los resultados de tres experimentos independientes (\*,  $p < 0,05$ , \*\*, 0,01, \*\*\*, 0,001).

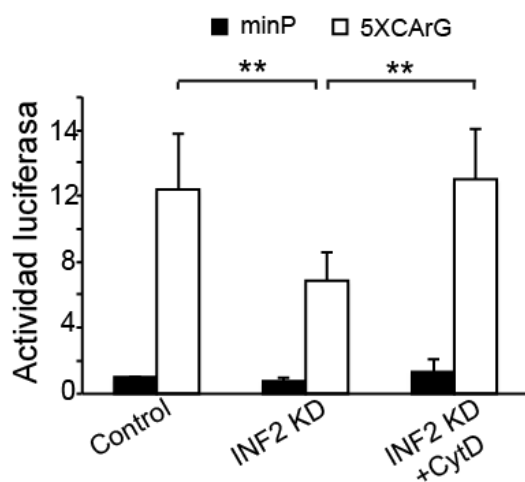
### La vía de señalización MRTF/SRF está afectada en las células INF2 KD

La G-actina libre regula la actividad transcripcional del complejo MRTF-SRF, de forma que un exceso de G-actina hace que MRTF se localice en el citoplasma mientras que en condiciones de poca G-actina MRTF entra en el núcleo y, junto con el factor transcripcional SRF dirige la transcripción de genes diana. Esta vía puede ser activada forzando la polimerización de actina o mediante el tratamiento con citocalasina D, un alcaloide producido por el hongo *Helminthosporidium*, conocido por su actividad despolimerizadora de actina y que además secuestra la G-actina libre impidiendo de esta forma que se una al factor MRTF.

El complejo MRTF/SRF activa la transcripción de genes con secuencias específicas de ADN llamadas cajas CArG. Estas cajas poseen una secuencia canónica CC(X)<sub>6</sub>GG donde

X puede ser adenina o timidina. Para ensayar el funcionamiento de esta vía utilizamos el plásmido pGL4.3.4 5XCArG, que contiene cinco secuencias de cajas CArG canónicas acompañadas de una caja TATA (promotor mínimo o minP) como promotor del gen que codifica para la enzima luciferasa, cuya medida de la actividad proporciona un valor cuantitativo de la actividad de la vía. Como control se utilizó un plásmido idéntico pero que carece de los elementos CArG y por lo tanto solo contiene la caja TATA (pGL4.3.4 minP). Tras la transfección se aplicaron los estímulos pertinentes, se lisaron las células y se determinó la actividad luciferasa añadiendo al extracto D-Luciferina, que es transformada por la luciferasa en oxiluciferina, reacción que emite luz, que es medida en un luminómetro.

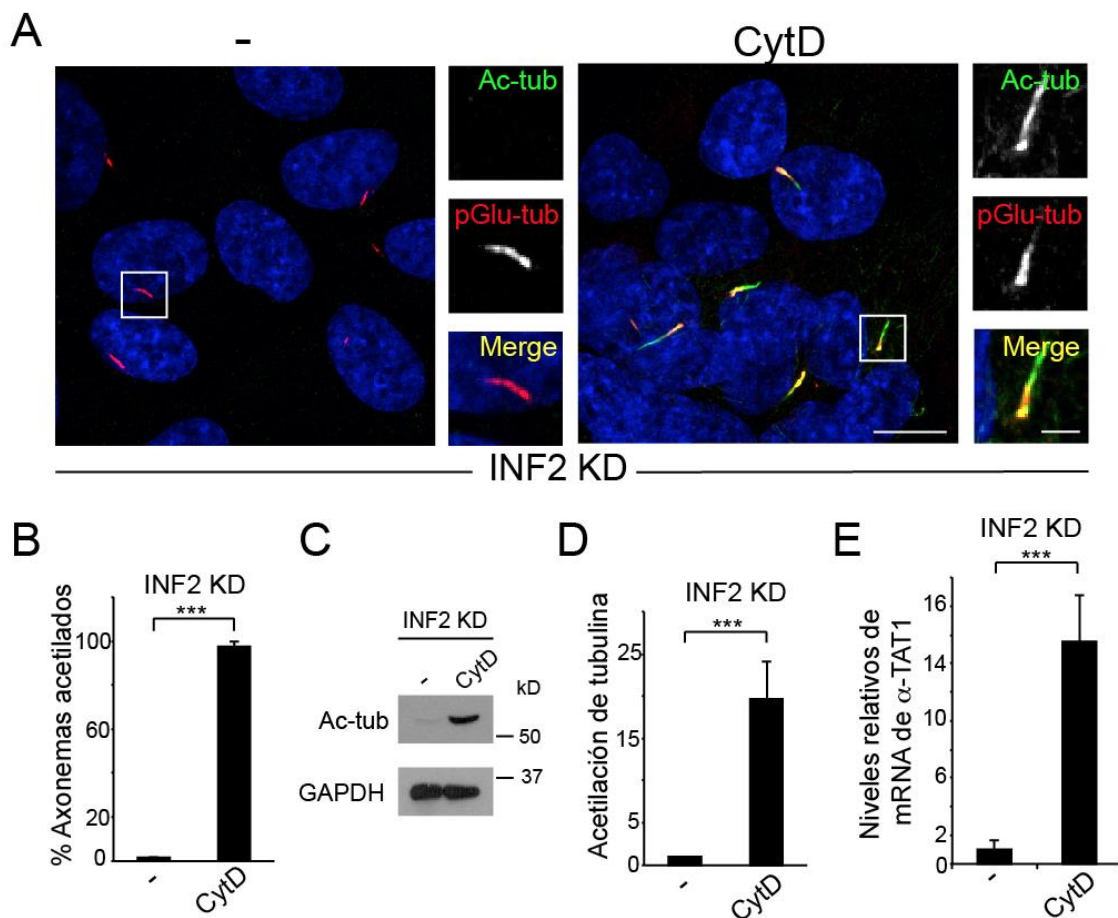
En el caso de las células control observamos que la actividad luciferasa en respuesta a estimulación con 20% de suero fue doce veces mayor en el caso del plásmido pGL4.3.4 5XCArG que con pGL4.3.4 minP. Por el contrario, las células INF2 KD fueron incapaces de activar la transcripción de luciferasa de forma tan eficiente, siendo la actividad luciferasa menor que en las células control. Este resultado indica que la ruta de transcripción mediada por MRTF/SRF es defectuosa en las células INF2 KD. Es de resaltar, que este defecto fue subsanado por el tratamiento de las células con citocalasina D, que activa la transcripción mediada por MRTF/SRF (Fig. 25).



**Figura 25. La vía de transcripción MRTF/SRF es deficiente en las células INF2 KD.** Se transfectó el plásmido pGL4.3.4 5XCArG o el pGL4.3.4 minP y se lisaron las células para determinar la actividad luciferasa tras tratarlas o no con citocalasina D. El histograma muestra los resultados de seis experimentos independientes (\*\*,  $p < 0,01$ ).



Para tratar de subsanar el defecto en acetilación de tubulina de las células INF2 KD utilizamos citocalasina D, que también es un inductor del proceso de ciliogénesis. La cuantificación del número de axonemas acetilados reveló que la citocalasina D fue capaz de revertir el defecto en la acetilación de tubulina (Fig. 26 A y B). La restauración de la acetilación de tubulina fue confirmada mediante experimentos de inmunotransferencia (Fig. 26 C y D). Este aumento de acetilación de la tubulina, además, correlacionó con un aumento de los niveles de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 (Fig. 26 E).



**Figura 26. La activación de la vía MRTF/SRF con citocalasina D recupera la acetilación de los microtúbulos en células INF2 KD.** (A) Las células INF2 KD tratadas con citocalasina D o con vehículo son fijadas y en ellas se inmunodetectaron tanto la tubulina acetilada como la poliglutamilada. (B) Se determinó el porcentaje de los axonemas acetilados (n= 365-383 células por punto experimental). (C) Las células tratadas con vehículo y citocalasina D fueron lisadas y preparadas para un ensayo de inmunotransferencia. (D) La cantidad de tubulina acetilada fue medida y los valores relativizado frente a los de GAPDH. En el gráfico estos valores se representan respecto al valor obtenido en las células INF2 KD. (E) Se extrajo el ARN total y se analizaron de forma cuantitativa los niveles de ARN mensajero de  $\alpha$ TAT1. El gráfico representa estos valores relativizados a la cantidad de GAPDH. En (A) los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los histogramas de (B,D) y (E) representan los datos de cuatro y cinco experimentos independientes, respectivamente (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

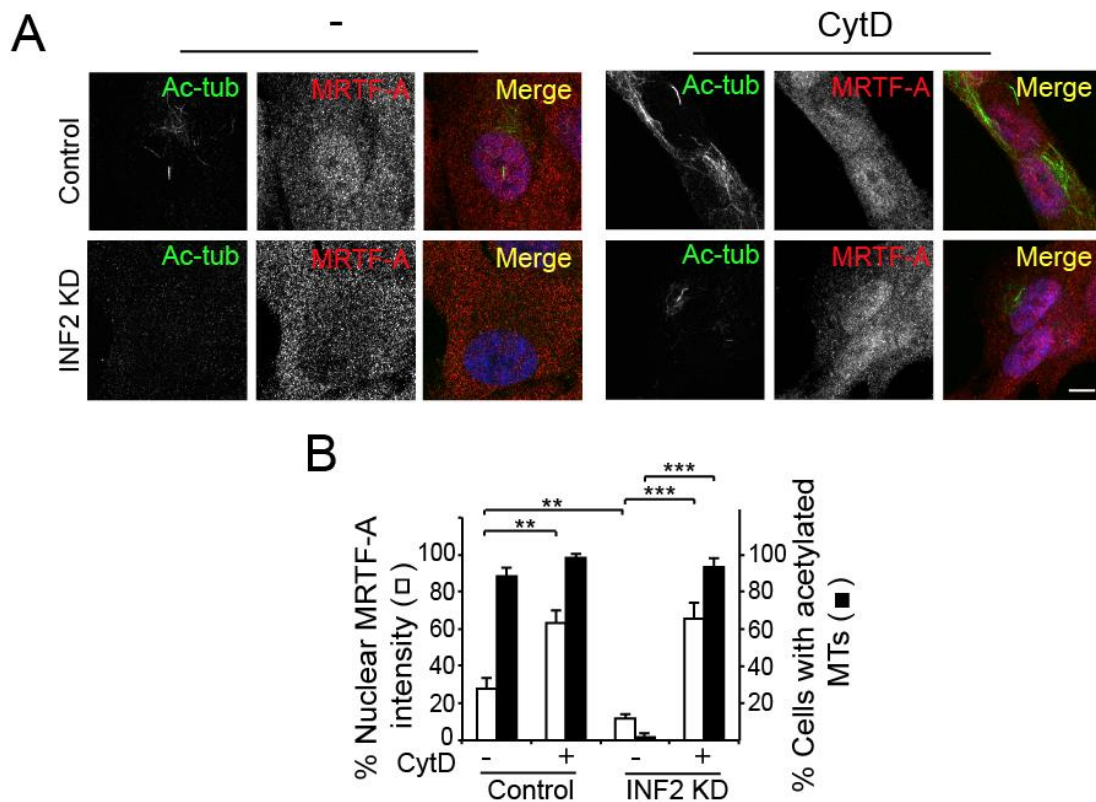
Estos resultados, en conjunto, nos muestran que la vía de señalización de MRTF está afectada en la línea INF2 KD y que la recuperación de esta vía corrige la falta de mRNA de  $\alpha$ -TAT1 y la acetilación de tubulina.

#### **La presencia de MRTF en el núcleo es menor en las células INF2 KD.**

Dado que la ruta de transcripción mediada por MRTF/SRF es defectiva en las células INF2 KD, se analizó la localización del factor MRTF de forma comparativa en las células control y en las células INF2 KD, mediante microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos específicos para MRTF-A. Para ello, las imágenes obtenidas se analizaron dividiendo cada célula entre zona nuclear y citoplásmica y se cuantificó la intensidad de la tinción en cada zona. Esta aproximación experimental reveló que las células INF2 KD tienen un contenido menor de MRTF nuclear que las células control y que el tratamiento con citocalasina D es capaz de corregir esta alteración al tiempo que aumenta el número de células con microtúbulos acetilados (Fig. 27 A y B).

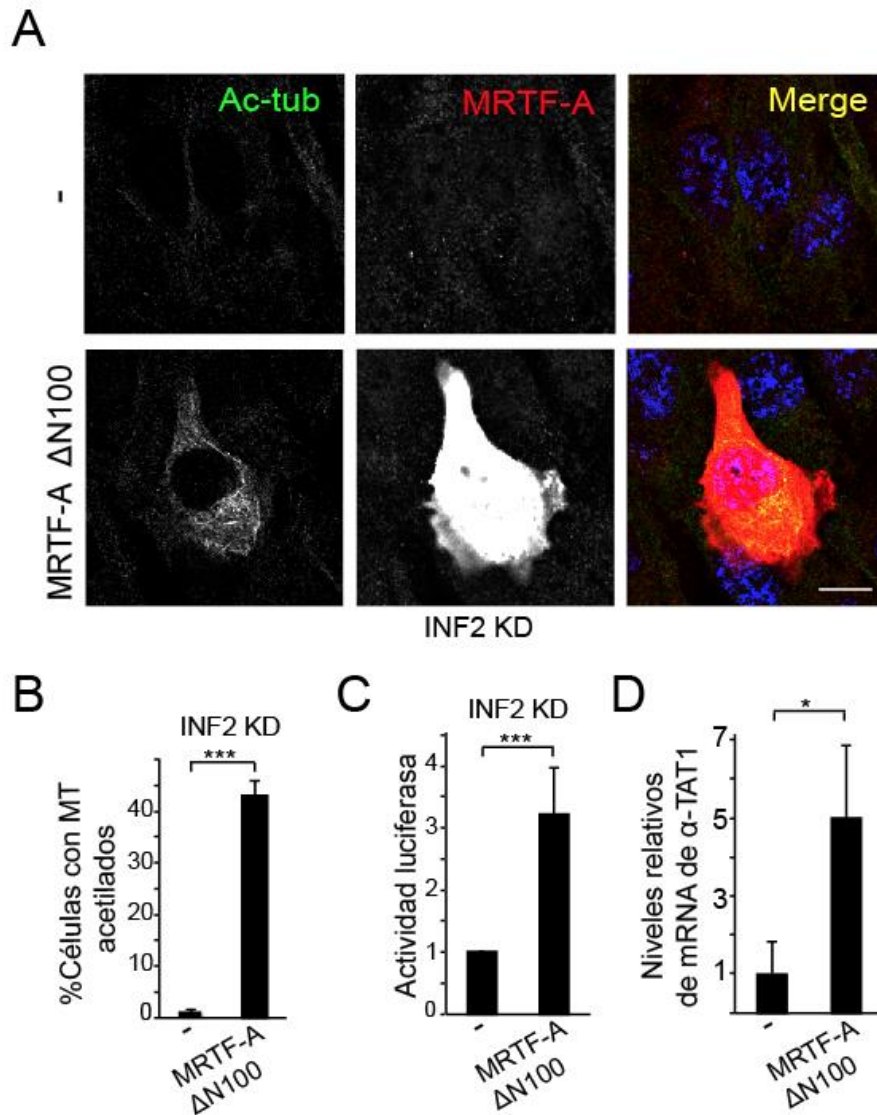
Para confirmar el papel de MRTF, se expresó el mutante MRTF-A  $\Delta$ N100 en las células INF2 KD. Este mutante carece de los cien primeros aminoácidos, que son los que contienen los dominios RPEL (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003) de interacción con G-actina y, por lo tanto, responsables de la retención de MRTF en el citoplasma. En consecuencia, la proteína mutada puede entrar al núcleo y difundir también por el citoplasma. Además, conserva su región C-terminal que es la que le confiere su funcionalidad transcripcional. La expresión de MRTF-A  $\Delta$ N100 en las células INF2 KD estimuló la acetilación de sus microtúbulos, que era deficiente (Fig. 28 A y B). Ese resultado indica que existe una clara correlación entre la acetilación de tubulina y la presencia de MRTF en el núcleo.





**Figura 27. El coactivador MRTF-A se encuentra principalmente en el citosol de las células INF2 KD.** Las células control o las INF2 KD fueron tratadas con 0,5  $\mu$ M citocalasina D o con vehículo durante 48 h. (A) Las células fueron fijadas e inmunodetectadas para la tubulina acetilada y MRTF-A. (B) Los niveles de MRTF-A en el núcleo y el porcentaje de células con microtúbulos acetilados fueron cuantificados (n= 300-450 células por punto experimental). Los núcleos de las células de (A) fueron teñidas con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. El histograma de (B) representa los datos de cuatro experimentos independientes (\*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001).

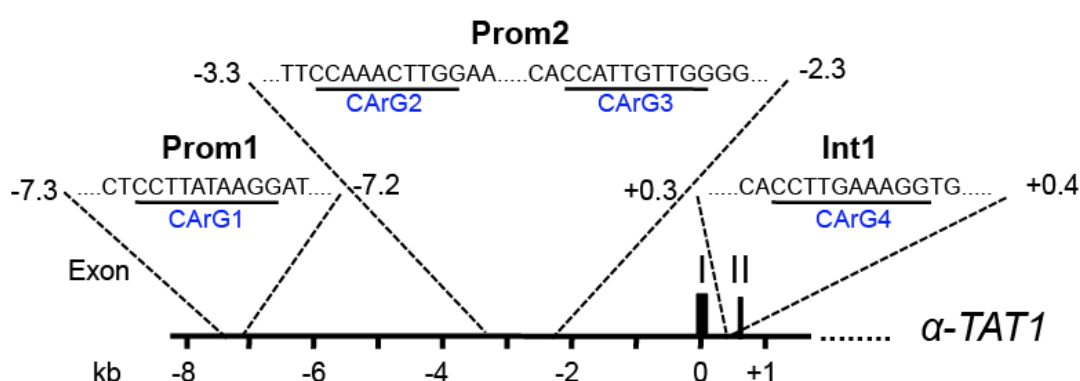
En apoyo de la hipótesis de que la falta de actividad transcripcional mediada por MRTF/SRF en las células INF2 KD sea debida a la falta de MRTF nuclear, se expresó MRTF-A  $\Delta$ N100 y se observó un aumento significativo en dicha actividad (Fig. 28 C). Además, el aumento de actividad transcripcional inducido por la expresión de MRTF-A  $\Delta$ N100 correlacionó con un incremento en los niveles del mRNA de  $\alpha$ -TAT1 (Fig. 28 D). En resumen, la falta de acetilación de tubulina debida a la ausencia de  $\alpha$ -TAT1 parece debida a la poca presencia de MRTF en el núcleo de las células INF2 KD.



**Figura 28. La expresión de una forma activa de MRTF-A recupera la acetilación de los microtúbulos de células INF2 KD.** Se expresó el mutante MRTF-A  $\Delta$ N100 en las células INF2 KD (A) y las células se fijaron. Se inmunodetectó la tubulina acetilada y MRTF-A. (B) Se determinó el porcentaje de células transfectadas que presentan microtúbulos acetilados (n= 350-400 células por punto experimental). (C) Se determinó la actividad luciferasa en células INF2 KD transfectadas con MRTF-A  $\Delta$ N100. (D) Se extrajo ARN total de las células INF2 KD transfectadas con MRTF-A  $\Delta$ N100 y sin transfectar y se analizaron cuantitativamente los niveles de mRNA de  $\alpha$ TAT1 y de GAPDH. El gráfico representa la cantidad de mRNA de  $\alpha$ TAT1 relativizado a la de GAPDH. En (A) los núcleos fueron teñidos con TO-PRO. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los histogramas (B, C) y (D) representan los datos de cuatro y tres experimentos independientes, respectivamente (\*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### El gen $\alpha$ -TAT1 contiene elementos de respuesta a MRTF/SRF

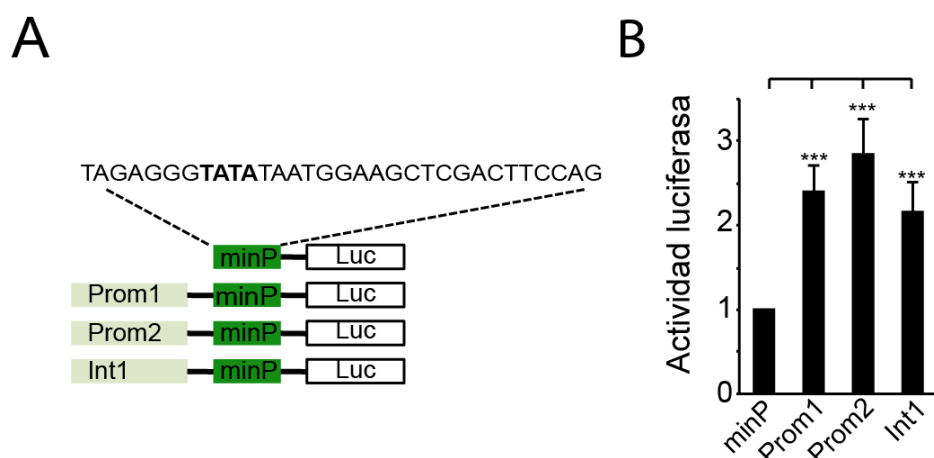
La inspección de la secuencia del gen  $\alpha$ -TAT1 reveló la existencia de secuencias CArG canónicas y de otras similares denominadas CArG-similares en las que existe una única variación en los 6 nucleótidos centrales con respecto a la secuencia canónica (elementos CArG-símiles).



**Figura 29.** El gen  $\alpha$ TAT1 contiene secuencias CArG y CArG-similares potenciales. Se indica la presencia de cuatro secuencias CArG y CArG-similares en el gen  $\alpha$ TAT1.

Para su análisis funcional se escogió un fragmento genómico que contiene una caja CArG consenso, a la que denominamos CArG1, presente 7,2 kb antes del codon ATG de iniciación de la traducción de  $\alpha$ -TAT1 y al que llamamos Prom1, un segundo fragmento denominado Prom2, que contiene dos elementos CArG-símiles a los que llamamos CArG2 y CArG3, y que está situada a 2,3 kb del ATG, y un tercer fragmento denominado Int 1 dentro del primer intrón que contiene una caja CArG-símil, a la que se llamó CArG4 (Fig 29). Cada uno de estos fragmentos se clonó sustituyendo a la secuencia de cinco elementos CArG consenso presentes en el vector pGL4.3.4 5XCArG y se ensayó su respuesta transcripcional a la activación del complejo MRTF/SRF mediante estimulación con suero y comparándola con la de un plásmido con solo el promotor mínimo (minP) (Fig. 30 A y B). Todos los fragmentos ensayados testados produjeron un incremento en la transcripción de luciferasa de entre dos y tres veces

respecto al plásmido minP, indicando que tienen elementos CArG funcionales (Fig. 30 B).

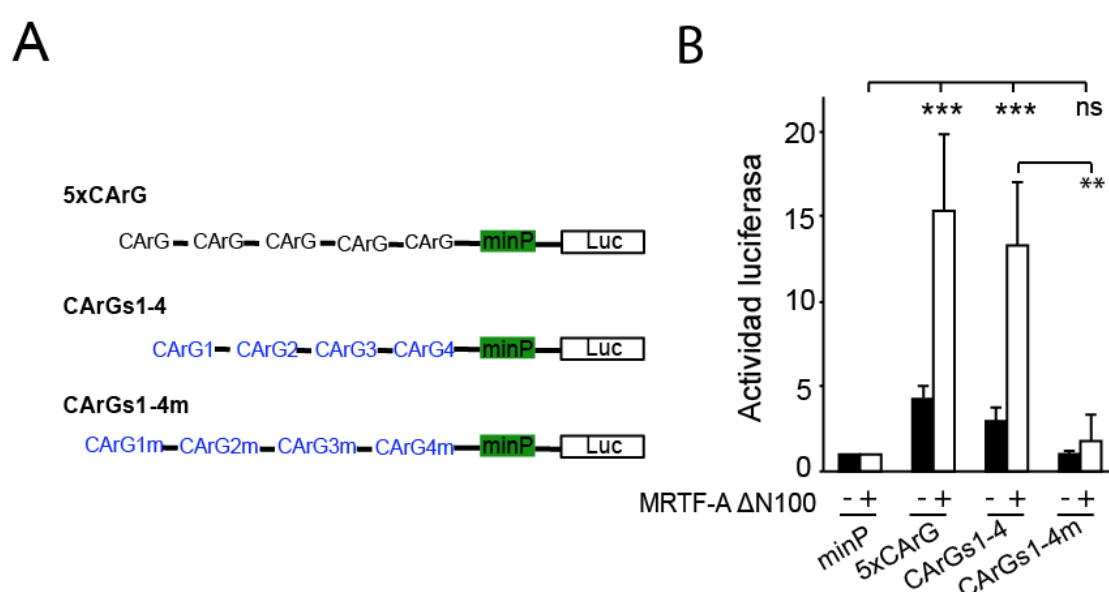


**Figura 30. Las zonas del gen  $\alpha$ TAT1 que contienen las sitios CArG activan la transcripción mediada por MRTF/SRF.** (A) Los fragmentos indicados del gen  $\alpha$ TAT1 que contienen secuencias CArG fueron clonadas independientemente en un vector luciferasa pGL4.3.4 5XCArG y su actividad fue medida en las células RPE1 control como se describe en Materiales y métodos. (B) Los resultados de la actividad luciferasa se representan en el histograma. El histograma de (B) muestra los resultados de siete experimentos independientes (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Para examinar la contribución de los cuatro elementos CArG de forma global se clonaron en tándem separados por secuencias espaciadoras reemplazando a los cinco CArG consenso del plásmido pGL4.3.4 5XCArG. A esta construcción se le denominó pGL4.3.4 CArGs1-4.. También se generó una construcción similar en la que los elementos CArGs1-4 de l gen  $\alpha$ -TAT1 se mutaron en sus tres bases centrales para sustituir sus A o T por G o C para convertirlos en inactivos. (Fig. 31 A). Esta construcción que fue denominada pGL4.3.4 CArG1s-4m y se utilizó como control negativo en nuestro ensayo. Otros controles utilizados fueron el plásmido pGL4.3.4 5XCArG para comprobar el funcionamiento correcto del ensayo y el pGL4.3.4 minP que nos informa de la actividad transcripcional basal del gen de la luciferasa.

El experimento se realizó en dos condiciones. Por un lado, se ensayó la actividad luciferasa generada por cada una de las construcciones transfectada en células control en ausencia de estímulo o cotransfectadas con el mutante activo MRTF-A  $\Delta$ N100. Las

medidas de actividad luciferasa obtenidas se relativizaron respecto al valor obtenido para la construcción minP en ausencia o presencia de MRTF-A  $\Delta$ N100. La actividad luciferasa fue mayor con el control positivo pGL4.3.4 5XCArG y algo menor con la construcción pGL4.3.4 CArG1-4. Esta actividad disminuyó notablemente con la construcción pGL4.3.4 mutCArG1-4 que contiene mutaciones en los elementos CArG del gen  $\alpha$ -TAT1 que los inactiva (Fig. 31 B). Este conjunto de experimentos indica que el gen  $\alpha$ -TAT1 contiene elementos CArG que responden a la expresión de MRTF activo, y por lo tanto funcionales.



**Figura 31. Las secuencias CArG presentes en el gen  $\alpha$ TAT1 son activadas por MRTF-A y su mutación neutraliza su actividad.** (A) Se clonaron los elementos CArG encontrados en el gen  $\alpha$ TAT1 sustituyendo la secuencia de las cinco cajas CArG canónicas de pGL4.3.4. 5XCArG dando lugar al plásmido pGL4.3.4 CArGs 1-4. (B) Se ensayó la actividad de pGL4.3.4 CArGs 1-4 en células control RPE1 que expresaban MRTF-A  $\Delta$ N100 o en ausencia de este factor y se compararon con la actividad del plásmido que posee los elementos CArG del gen  $\alpha$ TAT1 mutados pGL4.3.4 CArGs 1-4m y del plásmido pGL4.3.4 5XCArG. Los resultados se representan relativizados a los valores obtenidos con el plásmido pGL4.3.4 minP. El histograma representa los resultados de cuatro experimentos independientes (\*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001).

# Discusión

## Relación de las forminas con los microtúbulos

La acetilación de la  $\alpha$ -tubulina fue descrita hace más de 30 años (L'Hernault and Rosenbaum, 1985), siendo identificado posteriormente el residuo lisina 40 (K40) como la diana principal de acetilación (LeDizet and Piperno, 1987). Desde entonces se ha convertido en la modificación de tubulina estudiada más extensamente (Perdiz et al., 2011).

Aunque la primera función descrita para las forminas fue la de formar filamentos lineales de actina (Goode and Eck, 2007), en los últimos años se ha estudiado en mayor profundidad su influencia sobre el citoesqueleto microtubular (Bartolini and Gundersen, 2010; Chesarone et al., 2010; Goode and Eck, 2007), incluyendo principalmente la acetilación, la detirosinación y la estabilidad microtubular. A pesar de este esfuerzo, el mecanismo por el que las forminas regulan la acetilación de microtúbulos no ha sido esclarecido completamente. Durante los estudios desarrollados a lo largo del desarrollo de esta tesis hemos comprobado que el silenciamiento de INF2 produce una caída general en acetilación de microtúbulos, así como un incremento en la relación G-/F-actina. Una vez descartado que el efecto en la acetilación de tubulina se debiera a un descenso en estabilidad de los microtúbulos o a una mayor desacetilación en estas células, se comprobó que el ARN mensajero para la enzima responsable de dicha modificación, la tubulina acetil transferasa 1 ( $\alpha$ TAT1) (Kalebic et al., 2013; Shida et al., 2010), descendía hasta niveles casi indetectables.

La acetilación de la tubulina fue restaurada bien mediante la expresión de  $\alpha$ TAT1, indicando que no hay elementos adicionales en este proceso que estén afectados, o mediante tratamientos que inducen la activación de la vía de señalización MRTF/SRF, que es controlada por los niveles de G-actina. Este hallazgo nos llevó a identificar que la falta de acetilación de la tubulina en las células silenciadas para INF2 es debida a un funcionamiento incorrecto de la vía MRTF/SRF, que a su vez regula la transcripción del gen de  $\alpha$ TAT1. Por tanto INF2 afecta a la acetilación de microtúbulos a través de la regulación de la síntesis de la proteína  $\alpha$ TAT1 mediante el complejo transcripcional MRTF/SRF que activa la transcripción del gen  $\alpha$ TAT1.

Los estudios previos sobre la relación entre forminas y acetilación pusieron de manifiesto que la sobreexpresión de fragmentos FH1FH2 de 10 forminas de mamífero era capaz de inducir la acetilación de la tubulina y la activación de la vía MRTF/SRF (Copeland et al., 2004; Copeland y Treisman, 2002; Thurston et al., 2012; Tominaga et al., 2000; Young et al., 2008). Sin embargo, no se encontró una correlación clara entre ambos procesos aunque los fragmentos FH1FH2 de las tres forminas ensayadas que no poseían capacidad para activar la vía MRTF/SRF (Formina 1, Fhod1 y Fhod2) tampoco eran capaces de inducir acetilación de los microtúbulos.

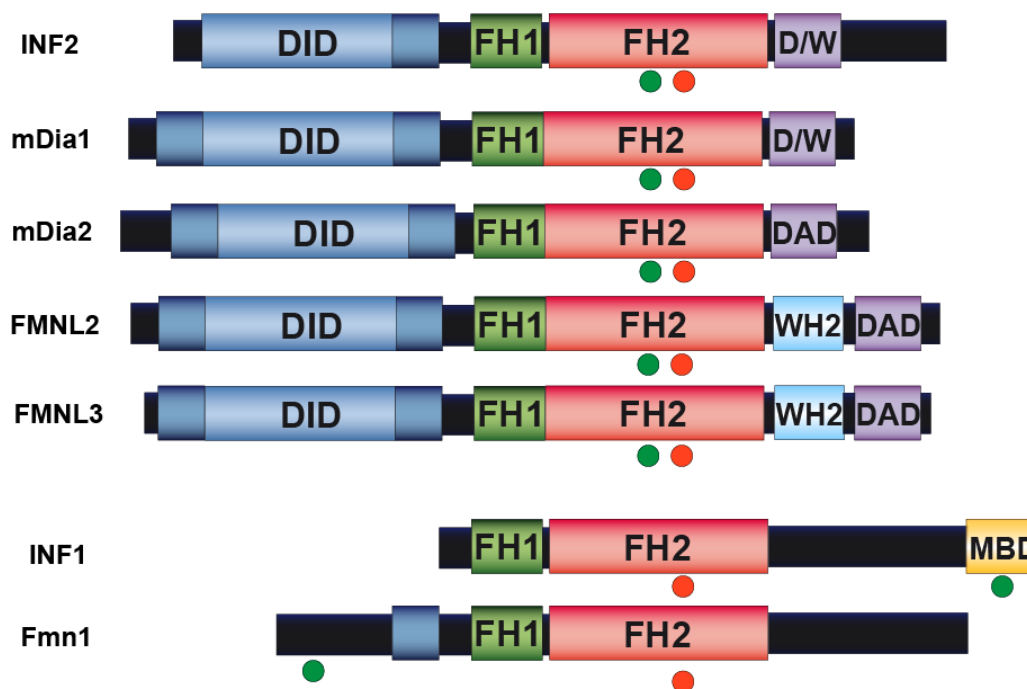
En nuestros experimentos hemos observado que la transfección de formas silvestres de ambas isoformas de INF2 (INF2-1 e INF2-2) en células RPE-1 inducen hiperacetilación en microtúbulos, lo cual es consistente tanto con un modelo de activación de vía MRTF/SRF y aumento de producción de  $\alpha$ TAT1 como de un modelo alternativo que, mediante la unión directa de la formina a los microtúbulos, implique un incremento en la estabilidad de los mismos, favoreciendo así su acetilación. Los mutantes KA de ambas isoformas de INF2 mantienen esta capacidad hiperacetiladora ya que se ha descrito que dicha mutación no afecta a la capacidad polimerizadora de actina de esta proteína (Ramabhadran et al., 2012). Sin embargo la mutación IA, que si neutraliza esta actividad redujo la cantidad de células hiperacetiladas, sugiriendo una posible contribución de la actividad polimerizadora de actina en la síntesis de  $\alpha$ TAT1. Aunque la acetilación se veía claramente disminuida con la mutación IA, todavía un porcentaje importante de células mostraba microtúbulos hiperacetilados, que interpretamos podría producirse por interacción directa de INF2 con los microtúbulos (Andres-Delgado et al., 2012; Bartolini et al., 2016) y la consiguiente estabilización de los mismos, ya que se ha observado en otras forminas como mDia2 que la estabilización de microtúbulos es independiente de la actividad polimerizadora de actina (Bartolini et al., 2008). De forma coherente con esta interpretación, observamos que la expresión de los fragmentos FH1FH2 y FH2 de INF2 restauraban la acetilación en las células INF2 KD mientras que el fragmento FH2 IA de INF2, sin capacidad polimerizadora de actina, no lo lograba ya que aunque este fragmento pudiera



aumentar la estabilidad de los microtúbulos, estos no pueden acetilarse debido a la falta de  $\alpha$ TAT1 en estas células.

Los resultados publicados sobre INF1 y acetilación y estabilización de microtúbulos nos permite una discusión interesante sobre el peso de la estabilización de los microtúbulos por un lado y el efecto sobre la inducción de la transcripción de  $\alpha$ TAT1. INF1 posee en su extremo carboxilo terminal un dominio de unión a microtúbulos (MBD) que por sí mismo, expresado de manera independiente del resto de la proteína, se une a microtúbulos, los estabiliza y induce su hiperacetilación (Young et al., 2008). Sin embargo, la expresión del fragmento FH1FH2, que carece de dominio MBD, de INF1 elimina su unión a los microtúbulos y, por tanto, este fragmento es incapaz de estabilizarlos y hacer que su acetilación aumente por este mecanismo (Young et al., 2008). No obstante este fragmento sí produce polimerización de actina y activa la vía MRTF/SRF e induce hiperacetilación de los microtúbulos (Thurston et al., 2012). Por tanto, INF1 mediante su dominio FH2 podría inducir la transcripción de  $\alpha$ TAT1 a través de la disminución de los niveles de G-actina e inducir una mayor acetilación a través de su dominio MBD, que estabiliza a los microtúbulos.

Basados en nuestros resultados y en las publicaciones previas se propone un modelo según el cual la acetilación que cada formina induce en microtúbulos es una composición de su efecto estabilizador sobre los mismos, que los presenta disponibles durante más tiempo para ser acetilados, y de su efecto inductor de la síntesis  $\alpha$ TAT1. Dependiendo de cada formina, un mecanismo u otro contribuirá en mayor medida a los niveles de acetilación de la tubulina. En el caso de INF2, a juzgar por los experimentos de sobreexpresión de la forma intacta y de la desprovista de capacidad polimerizadora, parece que la contribución de ambas es similar.



**Figura 32. Esquema de la estructura de diferentes forminas.** Los puntos verdes indican la zona de interacción con los microtúbulos mientras que los rojos muestran el dominio implicado en la polimerización de actina. Observamos dos grupos de forminas. Por un lado INF2, mDia1, mDia2, FMNL2 y FMNL3 interaccionan con los microtúbulos mediante su dominio FH2 mientras que INF1 y Fmn1 lo hacen mediante dominios adicionales. Por otro lado todas las forminas polimerizan actina mediante su dominio FH2. D/W (Dominio mixto DAD-WH2)

### Activación de INF2 en respuesta a G-actina

Una característica muy relevante de la molécula de INF2 es que posee un motivo WH2 de unión a G-actina dentro de su dominio DAD de autoinhibición (Chhabra and Higgs, 2006). La unión de G-actina al WH2/DAD desplaza al dominio DID, permitiendo la apertura de la proteína, su dimerización y su activación. La afinidad de la unión del WH2/DAD por G-actina es de orden submicromolar ( $K_d=0,06 \mu\text{M}$ ), superior a la descrita para la unión DID-DAD, que es del orden micromolar ( $K_d=1,1 \mu\text{M}$ ) (Chhabra et al., 2009; Ramabhadran et al., 2013). Esto hace factible el desplazamiento del DID y la consiguiente activación de INF2 por G-actina tal y como ha sido confirmado en experimentos *in vitro* con proteínas purificadas (Ramabhadran et al., 2013). El balance relativo de las afinidades del DAD por el DID y por la G-actina y el hecho de que ambos valores se aproximen a la concentración fisiológica de G-actina libre,

permite que la actividad de INF2 pueda ser regulada por variaciones pequeñas en la cantidad de G-actina libre (Ramabhadran et al., 2013).

Los valores de afinidad de WH2/DAD por G-actina y entre el DID y el DAD de INF2 contrastan con los descritos para mDia1, cuyo DAD une G-actina con afinidad micromolar ( $K_d > 50 \mu\text{M}$ ) (Gould et al., 2011; Heimsath and Higgs, 2012), mientras que la afinidad de la interacción DID-DAD es submicromolar ( $K_d = 0,28 \mu\text{M}$ ) (Wallar et al., 2006). En consecuencia con estos valores, mDia1 permanece autoinhibida en presencia de G-actina en los ensayos *in vitro* (Ramabhadran et al., 2013). A pesar de la baja afinidad de mDia1 por G-actina, mDia1 puede ser activada en respuesta a cantidades elevadas de G-actina citosólica (Tabla 1) como las producidas por tratamientos con inhibidores de polimerización de actina o por la sobreexpresión de mutantes no polimerizables de G-actina (Higashida et al., 2008).

Las forminas FMNL2, FMNL3 y DAAM1, también contienen secuencias que se asemejan a un motivo WH2. En el caso de FMNL3 se ha estudiado su afinidad por G-actina resultando ser de un valor intermedio ( $K_d = 3,2 \mu\text{M}$ ) de las observadas para INF2 y mDia1. Además, a pesar de poseer un dominio WH2 es probable que la unión de G-actina, no compita con la interacción autoinhibitoria DID-DAD de FMNL3 ya que el motivo WH2 está cerca pero no solapa con su DAD (Dominguez, 2016; Heimsath and Higgs, 2012; Vaillant et al., 2008).

En conclusión, el dominio WH2/DAD de alta afinidad para la unión de G-actina hace de INF2 una buena candidata para regular de manera precisa la homeostasis celular de actina.

### **La mecanosensación y las forminas**

Las células perciben los estímulos mecánicos de su entorno y responden remodelando su citoesqueleto. La G-actina liberada por esta reorganización del citoesqueleto desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la G- y F-actina (Higashida et al., 2013). Aunque varias forminas

parecen mediar este proceso, INF2 parece ser un mecanosensor muy relevante (Shao et al., 2015; Wales et al., 2016).

Proteína	Kd DID-DAD	Kd WH2- ó RPEL-actina
INF2	1,1	0,06
mDia1	0,28	>50
FMNL3	n.d.	3,2
MRTF-A	----	0,024

**Tabla I.** Se muestran las constantes de disociación de las interacciones DID-DAD de las forminas y la afinidad de sus dominios WH2 o similares a WH2 por actina. Los dominios DAD/WH2 solapan en INF2 y mDia1. También se indica la afinidad del dominio RPEL de MRTF-A por G-actina.

Nuestros resultados muestran evidencias de la importancia de INF2 en la homeostasis de actina frente a otra formina como es DIA1, ya que el silenciamiento de INF2 se reflejó en una relación G-/F-actina más elevada que en las de las células control, que a su vez fue similar a las encontradas en células silenciadas para DIA1. En coherencia con los resultados que muestran que la acetilación de la tubulina está regulada a nivel de la transcripción del gen  $\alpha TAT1$  por los niveles de G-actina, las células silenciadas para DIA1 tampoco presentaron un descenso significativo en los niveles de ARN mensajero de  $\alpha TAT1$  ni tampoco un descenso en la acetilación de microtúbulos. Estos resultados indican que la pérdida de acetilación de tubulina por el silenciamiento de INF2 no es un efecto general del silenciamiento de cualquier formina y coloca a la formina INF2 en un lugar relevante en la regulación de dicho proceso.

### Regulación del coactivador MRTF-A por INF2

La capacidad de INF2 para percibir los niveles de G-actina ( $K_d = 0,06 \mu M$ ) se encuentra asimismo en el mismo rango de afinidad que presenta la G-actina por el dominio RPEL ( $K_d = 0,024 \mu M$ ) de MRTF-A (Posern et al., 2004). De esta manera la regulación de la relación de G-/F-actina, en la que INF2 parece ocupar un papel primordial, regulará también la unión de G-actina a MRTF-A y la localización nuclear o citoplásmica de MRTF-A, dependiendo de si hay poca o mucha G-actina libre,

respectivamente. Como resultado de la localización de MRTF-A, el complejo transcripcional MRTF/SRF estará más o menos activo, reflejándose finalmente en mayores o menores niveles de producción de ARN mensajero de  $\alpha$ TAT1 y, en consecuencia, de la acetilación de la tubulina.

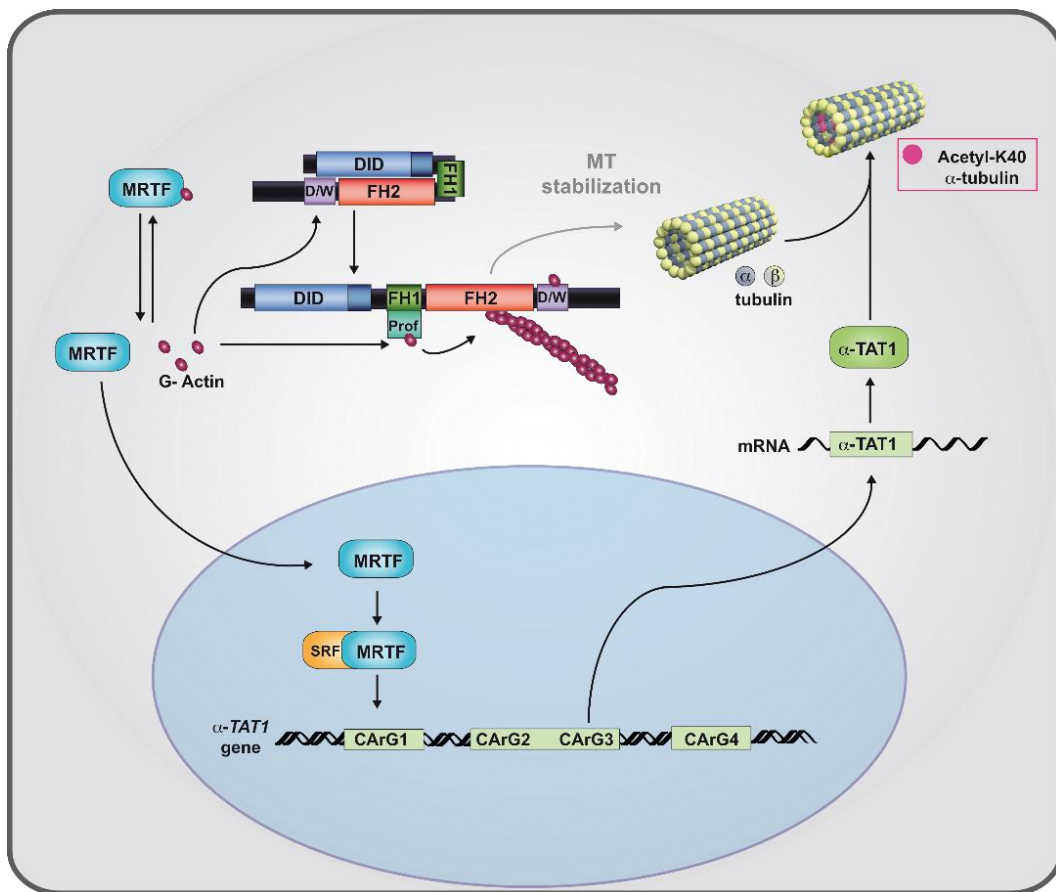
### **Patologías relacionadas con INF2**

Distintas mutaciones en la forma INF2 son responsables del 10-15% de los casos de glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS) autosómica dominante (Barua et al., 2013; Brown et al., 2010) y de aproximadamente el 75% de la FSGS combinada con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Boyer et al., 2011). Es interesante destacar que mientras el estudio de las mutaciones patológicas de INF2 se ha centrado hasta el momento en su efecto sobre el citoesqueleto de actina, estudios más recientes llevados a cabo en *C. elegans* con este tipo de mutantes apuntan a un efecto combinado en los microtúbulos y en el citoesqueleto de actina (Shaye and Greenwald, 2015).

Todas las mutaciones de INF2 que dan lugar a patología encontradas hasta la fecha se localizan en el DID y afectan su interacción con el DAD impidiendo el correcto cierre de la molécula y que la autoinhibición sea completa, siendo estas formas, por tanto, más activas. Probablemente estas patologías puedan deberse a que la unión del DID con el DAD pueda ser liberada con mucha más facilidad por G-actina que en la proteína INF2 intacta. De hecho, se ha descrito que en el caso de varias de las mutaciones implicadas en patología (E184K, R218Q y S186P) INF2 muestra una mayor afinidad por G-actina (Rollason, 2016). Es posible que la disminución de la afinidad de la unión autoinhibitoria del DID con el DAD haga que esta unión sea más fácil de abrir y que la G-actina pueda lograrlo a una concentración menor que en el caso de la forma INF2 intacta. La activación de INF2 induciría su actividad polimerizadora de actina y provocaría una disminución de la relación G-/F-actina que a su vez resultaría en una activación del complejo transcripcional MRTF/SRF. Puesto que la vía de regulación transcripcional mediada por MRTF/SRF regula la transcripción de un gran número de genes relacionados con la citoarquitectura (Olson and Nordheim, 2010), las

mutaciones patológicas de INF2 no solo afectarían a la síntesis de  $\alpha$ TAT1, con las consecuencias estructurales y funcionales que lleve aparejadas, como una mayor acetilación de los microtúbulos, sino a un grupo muy numeroso y variado de proteínas relacionadas con citoesqueleto.

Por tanto los resultados presentados en esta memoria de tesis no solo establecen un nexo entre el citoesqueleto de actina y la acetilación de los microtúbulos sino que además podrían arrojar algo de luz sobre la base molecular de las patologías debidas a mutaciones en la proteína INF2.



**Figura 33. Modelo de la regulación de la acetilación de microtúbulos por la forma INF2.** INF2 es liberada de su autoinhibición por la presencia de un exceso de G-actina. La actividad de polimerización de actina de INF2 disminuye la cantidad de G-actina libre en el citosol y esto hace que haya menos G-actina para unirse a MRTF. El MRTF libre entra en el núcleo, se une a SRF y el complejo MRTF/SRF activa la transcripción del gen  $\alpha$ TAT1. Como resultado final se produce más  $\alpha$ TAT1 y un aumento de la acetilación de los microtúbulos.

# Conclusiones

1. La expresión de la forma INF2 es necesaria para que la acetilación, pero no la poliglutaminación, de los microtúbulos se produzca de forma eficiente.
2. La falta de acetilación de los microtúbulos en células silenciadas para INF2 no es debida a una menor estabilidad de los microtúbulos ni a un aumento de su desacetilación.
3. El silenciamiento de INF2 produce la desaparición prácticamente completa del ARN mensajero de  $\alpha$ TAT1, que es la enzima responsable de la acetilación de microtúbulos.
4. La expresión exógena de  $\alpha$ TAT1 restaura la acetilación de microtúbulos en las células silenciadas para INF2.
5. La acetilación de los microtúbulos también se recupera por la sobreexpresión de otras formas o por fragmentos de ellas o de INF2 con el dominio catalítico FH2 intacto.
6. El silenciamiento de INF2, pero no el de la forma DIA1, aumenta la relación G-actina/F-actina.
7. El silenciamiento de INF2 disminuye los niveles del coactivador transcripcional MRTF-A presentes en el núcleo y la transcripción mediada por el complejo MRTF/SRF. Estos defectos se corrigieron por el tratamiento de las células con citocalasina D, que acompleja a la G-actina y activa la transcripción dependiente de MRTF/SRF.
8. La expresión de una forma constitutivamente activa del factor MRTF-A o el tratamiento con citocalasina D restauraron los niveles de ARN mensajero de  $\alpha$ TAT1 y la acetilación de los microtúbulos en las células silenciadas para INF2.
9. Se han identificado varios elementos funcionales de respuesta a la activación del complejo transcripcional MRTF/SRF en el gen de  $\alpha$ TAT1.



En resumen, INF2 regula la acetilación de los microtúbulos mediante el control de los niveles de G-actina, que a su vez controlan la localización subcelular de MRTF-A, cuya presencia en el núcleo es necesaria para que el complejo MRTF/SRF reconozca los elementos CArG del gen  *$\alpha$ TAT1* y se produzca su transcripción.

# **Bibliografía**

- Aguilar, A., L. Becker, T. Tedeschi, S. Heller, C. Iomini, and M.V. Nachury. 2014.  $\alpha$ -Tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell-substrate adhesion. *Mol. Biol. Cell.* 25:1854-1866.
- Andres-Delgado, L., O.M. Anton, Bartolini, F., A. Ruiz-Saenz, I. Correas, G.G. Gundersen, and M.A. Alonso. 2012. INF2 promotes the formation of deetyrosinated microtubules necessary for centrosome reorientation in T cells. *J. Cell Biol.* 198:1025-1037.
- Andres-Delgado, L., O.M. Anton, R. Madrid, J.A. Byrne, and M.A. Alonso. 2010. Formin INF2 regulates MAL-mediated transport of Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *Blood.* 116:5919-5929.
- Bartolini, F., L. Andres-Delgado, X. Qu, S. Nik, N. Ramalingam, L. Kremer, M.A. Alonso, and G.G. Gundersen. 2016. An mDia1-INF2 formin activation cascade facilitated by IQGAP1 regulates stable microtubules in migrating cells. *Mol. Biol. Cell.* 27:1797-1808.
- Bartolini, F., and G.G. Gundersen. 2010. Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta (Mol. Cell Res.)*. 1803:164-173.
- Bartolini, F., J.B. Moseley, J. Schmoranzler, L. Cassimeris, B.L. Goode, and G.G. Gundersen. 2008. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *J. Cell Biol.* 181:523-536.
- Barua, M., E.J. Brown, V.T. Charoonratana, G. Genovese, H. Sun, and M.R. Pollak. 2013. Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 83:316-322.
- Bouchet-Marquis, C., B. Zuber, A.-M. Glynn, M. Eltsov, M. Grabenbauer, K.N. Goldie, D. Thomas, A.S. Frangakis, J. Dubochet, and D. Chrétien. 2007. Visualization of cell microtubules in their native state. *Biol. Cell.* 99:45-53.
- Boyer, O., F. Nevo, E. Plaisier, B. Funalot, O. Gribouval, G. Benoit, E.H. Cong, C. Arrondel, M.-J. Tête, R. Montjean, L. Richard, A. Karras, C. Pouteil-Noble, L. Balafrej, A. Bonnardeaux, G. Canaud, C. Charasse, J. Dantal, G. Deschenes, P. Deteix, O. Dubourg, P. Petiot, D. Pouthier, E. Leguern, A. Guiochon-Mantel, I. Broutin, M.-C. Gubler, S. Saunier, P. Ronco, J.-M. Vallat, M.A. Alonso, C. Antignac, and G. Mollet. 2011. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N. Engl. J. Med.* 365:2377-2388.
- Brown, E.J., J.S. Schlondorff, D.J. Becker, H. Tsukaguchi, S.J. Tonna, A.L. Uscinski, H.N. Higgs, J.M. Henderson, and M.R. Pollak. 2010. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 42:72-76.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296:550-3.

- Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays*. 13:285-93.
- Burton, P.R. 1984. Luminal material in microtubules of frog olfactory axons: structure and distribution. *J. Cell Biol.* 99:520.
- Cen, B., A. Selvaraj, R.C. Burgess, J.K. Hitzler, Z. Ma, S.W. Morris, and R. Prywes. 2003. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol.* 23:6597-608.
- Copeland, J.W., S.J. Copeland, and R. Treisman. 2004. Homo-oligomerization is essential for F-actin assembly by the formin family FH2 domain. *J. Biol. Chem.* 279:50250-50256.
- Cueva, J.G., J. Hsin, K.C. Huang, and M.B. Goodman. 2012. Posttranslational acetylation of alpha-tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr Biol.* 22:1066-74.
- Chen, J.K., J. Taipale, M.K. Cooper, and P.A. Beachy. 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16:2743-2748.
- Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11:62-74.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2006. INF2 is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J. Biol. Chem.* 281:26754-26767.
- Chhabra, E.S., V. Ramabhadran, S.A. Gerber, and H.N. Higgs. 2009. INF2 is an endoplasmic reticulum-associated formin protein. *J. Cell Sci.* 122:1430-1440.
- Dominguez, R. 2016. The WH2 domain and actin nucleation: necessary but insufficient. *Trends Biochem. Sci.* 41:478-490.
- Dompierre, J.P., J.D. Godin, B.C. Charrin, F.P. Cordelières, S.J. King, S. Humbert, and F. Saudou. 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.* 27:3571-3583.
- Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in shape with formins. *Dev. Cell.* 10:693-706.
- Gaillard, J., V. Ramabhadran, E. Neumann, P. Gurel, L. Blanchoin, M. Vantard, and H.N. Higgs. 2011. Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Mol. Biol. Cell.* 22:4575-4587.

- Garvalov, B.K., B. Zuber, C. Bouchet-Marquis, M. Kudryashev, M. Gruska, M. Beck, A. Leis, F. Frischknecht, F. Bradke, W. Baumeister, J. Dubochet, and M. Cyrklaff. 2006. Luminal particles within cellular microtubules. *J. Cell Biol.* 174:759.
- Goode, B.L., and M.J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76:593-627.
- Gould, C.J., S. Maiti, A.e. Michelot, B.R. Graziano, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2011. The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation. *Curr. Biol.* 21:384-390.
- Hammond, J.W., C.-F. Huang, S. Kaech, C. Jacobson, G. Banker, and K.J. Verhey. 2010. Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol. Biol. Cell.* 21:572-583.
- Heimsath, E.G., and H.N. Higgs. 2012. The C terminus of formin FMNL3 accelerates actin polymerization and contains a WH2 domain-like sequence that binds both monomers and filament barbed ends. *J. Biol. Chem.* 287:3087-3098.
- Higashida, C., T. Kiuchi, Y. Akiba, H. Mizuno, M. Maruoka, S. Narumiya, K. Mizuno, and N. Watanabe. 2013. F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nat. Cell Biol.* 15:395-405.
- Higashida, C., S. Suetsugu, T. Tsuji, J. Monypenny, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2008. G-actin regulates rapid induction of actin nucleation by mDia1 to restore cellular actin polymers. *J. Cell Sci.* 121:3403.
- Higgs, H.N., and K.J. Peterson. 2005. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell.* 16:1-13.
- Howes, S.C., G.M. Alushin, T. Shida, M.V. Nachury, and E. Nogales. 2014. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol. Biol. Cell.* 25:257-266.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, M. Okamoto, T. Furuyashiki, T. Kato, and S. Narumiya. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* 3:8-14.
- Janke, C. 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* 206:461-472.
- Janke, C., and J.C. Bulinski. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 12:773-786.
- Kalebic, N., S. Sorrentino, E. Perlas, G. Bolasco, C. Martinez, and P.A. Heppenstall. 2013. aTAT1 is the major a-tubulin acetyltransferase in mice. *Nat. Commun.* 4.

- Kim, G.-W., L. Li, M. Gorbani, L. You, and X.-J. Yang. 2013. Mice lacking  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1 are viable but display  $\alpha$ -tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion. *J. Biol. Chem.* 288:20334-20350.
- Konishi, Y., and M. Setou. 2009. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.* 12:559-567.
- Korobova, F., V. Ramabhadran, and H.N. Higgs. 2013. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science.* 339:464-467.
- Kovar, D.R., and T.D. Pollard. 2004. Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat Cell Biol.* 6:1158-9.
- Kreitzer, G., G. Liao, and G.G. Gundersen. 1999. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* 10:1105-1118.
- L'Hernault, S., and J. Rosenbaum. 1985. Chlamydomonas  $\alpha$ -tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon amino group of a lysine. *Biochemistry.* 24:473-478.
- LeDizet, M., and G. Piperno. 1987. Identification of an acetylation site of Chlamydomonas  $\alpha$ -tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5720-5724.
- Lin, S.X., G.G. Gundersen, and F.R. Maxfield. 2002. Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (Glu) microtubules and kinesin. *Mol. Biol. Cell.* 13:96-109.
- Madrid, R., J.F. Aranda, A.E. Rodríguez-Fraticelli, L. Ventimiglia, L. Andres-Delgado, M. Shehata, S. Fanayan, H. Shahheydari, S. Gomez, A. Jimenez, F. Martin-Belmonte, J.A. Byrne, and M.A. Alonso. 2010. The formin INF2 regulates basolateral-to-apical transcytosis and lumen formation in association with Cdc42 and MAL2. *Dev. Cell.* 18:814-827.
- Manor, U., S. Bartholomew, G. Golani, E. Christenson, M. Kozlov, H. Higgs, J. Spudich, and J. Lippincott-Schwartz. 2015. A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *eLife.* 4:e08828.
- Miralles, F., G. Posern, A.-I. Zaromytidou, and R. Treisman. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* 113:329-342.
- Morley, S.J., Y. Qi, L. Iovino, L. Andolfi, D. Guo, N. Kalebic, L. Castaldi, C. Tischer, C. Portulano, G. Bolasco, K. Shirlekar, C.M. Fusco, A. Asaro, F. Fermani, M. Sundukova, U. Matti, L. Reymond, A. De Ninno, L. Businaro, K. Johnsson, M. Lazzarino, J. Ries, Y. Schwab, J. Hu, and P.A. Heppenstall. 2016. Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice. *eLife.* 5:e20813.

- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman, and B.L. Goode. 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*. 15:896-907.
- Muehlich, S., R. Wang, S.-M. Lee, T.C. Lewis, C. Dai, and R. Prywes. 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 28:6302-6313.
- Nogales, E., M. Whittaker, R.A. Milligan, and K.H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell*. 96:79-88.
- Olson, E.N., and A. Nordheim. 2010. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:353-365.
- Panzer, L., L. Trübe, M. Klose, B. Joosten, J. Slotman, A. Cambi, and S. Linder. 2016. The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility of podosomes. *J. Cell Sci.* 129:298-313.
- Paul, M.D., D. Fernandez, W. Pryse-Phillips, and M.H. Gault. 1990. Charcot-Marie-Tooth disease and nephropathy in a mother and daughter with a review of the literature. *Nephron*. 54:80-85.
- Pawlowski, R., E.K. Rajakyla, M.K. Vartiainen, and R. Treisman. 2010. An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J.* 29:3448-58.
- Perdiz, D., R. Mackeh, C. Poüs, and A. Baillet. 2011. The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cellular Signalling*. 23:763-771.
- Portran, D., L. Schaedel, Z. Xu, M. Thery, and M.V. Nachury. 2017. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol.* 19:391-398.
- Posern, G., F. Miralles, S. Guettler, and R. Treisman. 2004. Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J.* 23:3973-3983.
- Ramabhadran, V., P.S. Gurel, and H.N. Higgs. 2012. Mutations to the formin homology 2 domain of INF2 protein have unexpected effects on actin polymerization and severing. *J. Biol. Chem.* 287:34234-34245.
- Ramabhadran, V., A.L. Hatch, and H.N. Higgs. 2013. Actin monomers activate inverted formin 2 by competing with its autoinhibitory interaction. *J. Biol. Chem.* 288:26847-26855.

- Ramabhadran, V., F. Korobova, G.J. Rahme, and H.N. Higgs. 2011. Splice variant-specific cellular function of the formin INF2 in maintenance of Golgi architecture. *Mol. Biol. Cell.* 22:4822-4833.
- Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 16:2166-2172.
- Rollason, R., Wherlock M, Heath JA, Heesom KJ, Saleem MA, Welsh GI. 2016. Disease causing mutations in inverted formin 2 regulate its binding to G-actin, F-actin capping protein (CapZ  $\alpha$ -1) and profilin 2. *Biosci Rep.* 13::e00302.
- Rose, R., M. Weyand, M. Lammers, T. Ishizaki, M.R. Ahmadian, and A. Wittinghofer. 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature.* 435:513-8.
- Schönichen, A., and M. Geyer. 2013. Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research.* 1803:152-163.
- Seth, A., C. Otomo, and M.K. Rosen. 2006. Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRL $\epsilon^{\pm}$  and mDia1. *J. Cell Biol.* 174:701.
- Shao, X., Q. Li, A. Mogilner, A.D. Bershadsky, and G.V. Shivashankar. 2015. Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear actin rim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112:E2595-E2601.
- Sharma, S., E.E. Grintsevich, J. Woo, P.S. Gurel, H.N. Higgs, E. Reisler, and J.K. Gimzewski. 2014. Nanostructured self-assembly of inverted formin 2 (INF2) and F-actin-INF2 complexes revealed by atomic force microscopy. *Langmuir.* 30:7533-9.
- Shaye, D.D., and I. Greenwald. 2015. The disease-associated formin INF2/EXC-6 organizes lumen and cell outgrowth during tubulogenesis by regulating F-actin and microtubule cytoskeletons. *Dev. Cell.* 32:743-755.
- Shida, T., J.G. Cueva, Z. Xu, M.B. Goodman, and M.V. Nachury. 2010. The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ -TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:21517-21522.
- Skau, C.T., R.S. Fischer, P. Gurel, H.R. Thiam, A. Tubbs, M.A. Baird, M.W. Davidson, M. Piel, G.M. Alushin, A. Nussenzweig, P.S. Steeg, and C.M. Waterman. 2016. FMN2 Makes Perinuclear Actin to Protect Nuclei during Confined Migration and Promote Metastasis. *Cell.* 167:1571-1585 e18.
- Skau, C.T., S.V. Plotnikov, A.D. Doyle, and C.M. Waterman. 2015. Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to



- drive extracellular matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112:E2447-E2456.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-45.
- Thurston, S.F., W.A. Kulacz, S. Shaikh, J.M. Lee, and J.W. Copeland. 2012. The ability to induce microtubule acetylation is a general feature of formin proteins. *PLoS ONE*. 7:e48041.
- Vaillant, D.C., S.J. Copeland, C. Davis, S.F. Thurston, N. Abdennur, and J.W. Copeland. 2008. Interaction of the N- and C-terminal autoregulatory domains of FRL2 does not inhibit FRL2 activity. *J. Biol. Chem*. 283:33750-33762.
- Wales, P., C.E. Schuberth, R. Aufschneider, J. Fels, I. Garcia-Aguilar, A. Janning, C.P. Dlugos, M. Schäfer-Herte, C. Klingner, M. Wälte, J. Kuhlmann, E. Menis, L. Hockaday Kang, K.C. Maier, W. Hou, A. Russo, H.N. Higgs, H. Pavenstädt, T. Vogl, J. Roth, B. Qualmann, M.M. Kessels, D.E. Martin, B. Mulder, and R. Wedlich-Söldner. 2016. Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *eLife*. 5:e19850.
- Wallar, B.J., B.N. Stropich, J.A. Schoenherr, H.A. Holman, S.M. Kitchen, and A.S. Alberts. 2006. The basic region of the diaphanous-autoregulatory domain (DAD) is required for autoregulatory interactions with the diaphanous-related formin inhibitory domain. *J Biol Chem*. 281:4300-7.
- Wloga, D., and J. Gaertig. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci*. 123:3447-3455.
- Xu, Y., J.B. Moseley, I. Sagot, F. Poy, D. Pellman, B.L. Goode, and M.J. Eck. 2004. Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*. 116:711-723.
- Xu, Z., L. Schaedel, D. Portran, A. Aguilar, J. Gaillard, M.P. Marinkovich, M. Thery, and M.V. Nachury. 2017. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science*. 356:328-332.
- Young, K.G., S.F. Thurston, S. Copeland, C. Smallwood, and J.W. Copeland. 2008. INF1 is a novel microtubule-associated formin. *Mol. Biol. Cell*. 19:5168-5180.
- Zhou, F., P. Leder, and S.S. Martin. 2006. Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2. *Exp. Cell Res*. 312:1119-1126.
- Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16:99-105.